



**HAL**  
open science

# Modulation fonctionnelle des cellules dendritiques par les “ Neutrophil Extracellular Traps ”

Lorena Barrientos

► **To cite this version:**

Lorena Barrientos. Modulation fonctionnelle des cellules dendritiques par les “ Neutrophil Extracellular Traps ”. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA114833 . tel-01016696

**HAL Id: tel-01016696**

**<https://theses.hal.science/tel-01016696>**

Submitted on 1 Jul 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD  
Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry

ÉCOLE DOCTORALE 425

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : du fondamental à l'appliqué

Pôle : PHARMACOLOGIE - TOXICOLOGIE

**DISCIPLINE : IMMUNOLOGIE**

Année 2012/2013

Série Doctorat N°1253

**THÈSE DE DOCTORAT**

*par*

***Lorena Silvana Barrientos***

soutenue le 04/11/2013

**Modulation fonctionnelle des cellules dendritiques  
par les "Neutrophil Extracellular Traps"**

**Composition du jury :**

Pr Sylvie Chollet-Martin	<b>Directeur de thèse</b>	Professeur des universités - INSERM UMR-S 996, Université Paris Sud Praticien Hospitalière - Hôpital Bichat
Dr Viviana Marin-Esteban	<b>Co-encadrant de thèse</b>	Maître de conférence - INSERM UMR-S 996, Université Paris Sud
Dr Nuala Mooney	Rapporteur	Directeur de recherche CNRS - INSERM UMR-S 940, Institut Universitaire d'Hématologie
Dr Jamel El benna	Rapporteur	Directeur de recherche CNRS - INSERM U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon CRB3
Dr Pierre Bruhns	Examineur	Directeur de Recherche 2ème classe - INSERM U760, Institut Pasteur
Dr Michel Chignard	Examineur	Directeur de Recherche 1ère classe - INSERM U874, Institut Pasteur



A mes parents  
A Cintia et Diego,  
A Seba et Facu  
A Ana Paula,

Je leur dédie cette thèse, qu'elle soit le symbole de ma reconnaissance et  
de toute mon affection



« Los genios no existen. A la capacidad individual hay que agregarle siempre el trabajo y la dedicación. El genio se construye con sangre, sudor y lágrimas.... »  
*Les génies n'existent pas. A titre individuel, il faut ajouter toujours le travail et le dévouement. Le génie est construit avec du sang, de la sueur et des larmes ....*

Dr Rene Favaloro  
Médecin cardiologue argentin  
(1923-2000)



# Remerciements

Je souhaite remercier le **Dr Nuala Mooney** et le **Dr Jamel El benna** de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je tiens également à remercier le **Dr Pierre Bruhns** d'avoir accepté de juger ce travail ainsi que le **Dr Michel Chignard** d'avoir accepté d'évaluer mon travail d'abord dans mon comité de mi- thèse puis de faire partie de ce jury.

Je remercie énormément ma directrice de thèse, le **Pr Sylvie Chollet-Martin**, de m'avoir proposé ce sujet de recherche et de m'avoir fait confiance pour le mener à son terme. Le mot « merci » est trop petit pour englober toute mon affection ... vous avez été à mes côtés dès le début de mon parcours à Paris quand je ne parlais pas un mot de français. Vous m'avez permis de développer mes aptitudes à l'hôpital et au laboratoire de la Faculté. Je vous remercie pour votre encadrement scientifique, votre droiture, votre bienveillance, vos conseils et vos encouragements de tous les instants. Bien que le destin nous sépare professionnellement, Paris nous offre une grande diversité d'activités pour partager encore de bons moments.

Je remercie le **Pr Marc Pallardy** de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire INSERM UMR-S 996 et de m'avoir fourni les moyens de mener cette recherche à bien.

Je remercie également ma co-encadrante le **Dr Viviana Marin-Esteban** pour ses conseils scientifiques aussi nombreux que précieux, le partage de son savoir, sa disponibilité, ses encouragements en toutes circonstances, pour son sourire et sa bonne humeur. Je t'admire énormément, nous avons partagé quatre ans d'échanges professionnels et d'amitié. Tu ne m'as pas simplement transmis tout ton savoir-faire mais aussi le goût pour Picard. Je te souhaite tout le bonheur dans tous tes projets et j'espère nous allons trouver le temps de nous revoir, pour l'instant je ne serai pas très loin de chez toi pour partager un café (au lait) de temps en temps.

Une grand GRAND merci à **Roseline Gorges**, pour TOUT et « tout » reste insuffisant pour décrire ce que tu as fait pour moi. Tu m'as appris l'art de la culture

cellulaire, la précision dans les mesures et la rigueur dans le travail de laboratoire. Nous avons partagé des après-midi et soirées de manips interminables avec nos chères cellules. J'ai toujours su que je pouvais compter sur la « maison d'hôte » chez Roseline » avec dîner et petit-déjeuner compris, quand il était trop tard pour rentrer à Paris. Je change de labo mais pas de ville, mais même si je partais à l'étranger notre amitié est très forte, et nous avons le « grand » voyage à organiser. Tu vas me manquer énormément.

Je remercie les membres de l'équipe NETs : le **Dr Luc de Chaisemartin**, le **Dr Catherine Sandré** et **Vanessa Granger**. Luc merci pour tes recommandations, ta vision des choses et pour les discussions très instructives autour de notre sujet « les NETs » ; et aussi bien sûr pour tes macarons. Catherine, c'est toi qui a initié l'étude sur les NETs, merci pour avoir partagé ton savoir avec moi quand j'en ai eu besoin. Vanessa tu commences ce chemin sur le sujet « NETs », je te souhaite beaucoup chance dans la découverte des fonctions de ces petits filaments.

Je remercie les autres membres du groupe Immuno, le **Dr Isabelle Turbica** et le **Dr Aude Gleizes** pour vos conseils et nos discussions sur l'interaction PN-DC. Vous m'avez accueillie très chaleureusement quand je suis arrivée pour faire mon Master et vous m'avez tout de suite intégrée dans votre groupe. Merci aussi pour remplir la boîte de gâteaux indispensable pour « l'instant sucre » en fin d'après-midi quand les manips se prolongeaient tard. Merci **Nicolas Sémiramoth**, ancien thésard du laboratoire d'Immuno, pour tous nos échanges et discussions, j'ai toujours apprécié ton point de vue de la recherche.

Je remercie particulièrement **Zeina El Ali** et **Yann Gallais**, pour votre amitié et votre soutien. Zeina, nous avons fait tout ce chemin ensemble, dès mon arrivée dans l'équipe, nous nous sommes immédiatement bien entendues et notre amitié ne cesse de grandir. Merci pour tous les moments partagés : les manips DC et THP1, les soirées au labo pour isoler et mettre en culture les cellules, les restos (McDo, l'italien, le libanais et le sushi), les voyages, les rigolades, le partage d'expériences et nos longues discussions sur la vie et nos différents points de vue. Continue avec ta bonne humeur, le bout est à portée de la main ... ne désespère pas. Quand tout sera devenu calme, nous organiserons nos prochaines aventures. Yann, nous avons partagé la thématique PN-DC, toi avec tes petites vésicules moi avec mes filaments

de chromatines, et puis nous avons galéré ensemble avec les DC activées/mortes, maintenant tu deviens Mr moDC et bientôt l'expert j'espère ; essaie de leur parler doucement et met quelques mots en espagnol peut-être que ça leur plaira. Merci pour nos longues discussions philosophiques et scientifiques, pour être là quand j'avais besoin de parler, de libérer les tensions de la journée et pour les rigolades. Maintenant je pars travailler au côté d'Aude, on continuera à se voir, j'ai encore plein restos à te proposer ou simplement pour partager un Martini bien frais.

Je remercie aussi les jeunes du labo : les **Marias (Marie, Marie-Alix et Marie Éliane), Romain Natacha et Soumaya**, qui sont devenues au cours du temps plus que des collègues, des amis et qui, je l'espère, le resteront encore longtemps quel que soit le parcours de chacun d'entre nous. Marie merci pour ta bonne humeur, tes rigolages, ta voiture ; reste zen, même si parfois cela paraît difficile et je vais te dire que la seule chose qui ne va pas me manquer ce sont tes allusions au « vomis » à chaque repas. Marie-Alix, merci pour les échanges scientifiques et personnels, pour les soirées neutrophiles partagées ; j'ai bien aimé partager avec toi le voyage à Milan : les soirées apéro et la journée shopping, ah ! aussi le congrès. Bon courage pour la fin. Natacha, j'ai la chance de te connaître, tu es une fille exceptionnelle, toujours très motivée ; merci pour les échanges scientifiques et à propos des bébés. Marie Éliane, Romain et Soumaya, merci pour les repas partagés, les discussions autour de la table et les rigolades.

Je tiens à remercier le **Dr Armelle Biola-vidamment** et le **Pr Saadia Kerdine-Römer** pour les échanges scientifiques et vos conseils. Je vous apprécie et respecte énormément vos avis. Merci de m'avoir encouragée et aidée pendant mon ATER en immunotoxicologie, et merci pour votre soutien tout au long de mon parcours.

Je veux aussi remercier les autres membres de l'équipe : **Marie-Hélène, Isabelle** et **Muriel** pour leur aide, leur sympathie et leur disponibilité tout au long de ma thèse.

Je remercie le **Dr Laurent Mascarell, Claire Gueguen, le Dr Karl Balabanian** et **Alexandre Bignon** pour avoir apporté leur savoir-faire technique et scientifique à mon travail.

Je tiens également à remercier toutes les personnes avec qui nous avons collaboré pendant ces trois années : le **Dr Elsa Bianchini**, **Yasmine Bourti**, le **Dr Vanessa Lievin-Le Moal**, **Valérie Nicolas**, **Céline Boursier** et **Claudine Deloménie**. Merci pour le temps que vous m'avez accordé.

Je remercie aussi le **Dr Paul Telolahy**, **Catherine le-Callonec** et le **Dr Rime Yubeli**, qui ont fait que mon parcours dans l'enseignement a été agréable.

Merci aux anciens de l'unité : les **Drs Cathy Nihm**, **Camille Migdal** et **Aurélie Pépin**, pour les échanges professionnels et personnels ainsi qu'à tous les étudiants et stagiaires que j'ai pu rencontrer durant toutes ces années : **Ratana**, **Gaëlle** et **Marie**.

Heureusement le laboratoire n'est pas toute ma vie, même s'il y a eu quelques « nocturnes » parfois !

Je désire remercier tout d'abord ma famille, mes parents **Ana et David** qui m'ont toujours soutenue dans toutes mes décisions, je vous aime. Ma sœur **Cintia** pour avoir toujours cru en moi et parfois plus que moi-même, merci pour ton soutien inconditionnel. Mes frères **Sebastian** et **Facundo** pour être toujours à mes côtés malgré la distance. Mon beau-frère Diego pour son soutien et ses encouragements. Ma petite nièce **Ana Paula**, la lumière de ma vie.

Je pense aussi aux autres membres de ma famille qui m'ont soutenue aussi et qui sont toujours contents de mes réussites.

**Mes amis** à Paris, Buenos Aires, Cordoba, Salta et même Okinawa ; je vous aime et je vous serai toujours reconnaissante pour votre soutien.

Enfin, je ne les oublie pas, merci aux donneurs « anonymes » de neutrophiles et cellules dendritiques qui ont permis la réalisation de mes recherches. Les PN morts pour la recherche, et un petit merci aux DC qui m'ont fait galérer pendant pas mal du temps. A Google, qu'aurais-je fait sans ses outils : traducteur et scholar. A PubMed pour m'avoir aidée à trouver la bibliographie nécessaire pour ce travail. A YouTube pour l'accompagnement musical, principalement au cours la rédaction.

# *Table des matières*

Abréviations .....	1
Avant-propos.....	9
Introduction .....	15
Chapitre 1 : Les polynucléaires neutrophiles.....	17
1.1. Ontogenèse, différenciation et maturation .....	19
1.2. Migration .....	22
1.2.1. Inversion de la migration .....	24
1.2.2. Mécanismes originaux .....	24
1.3. Reconnaissance et élimination des agents pathogènes par les PN.....	25
1.3.1. Phagocytose .....	28
1.3.2. Dégranulation .....	32
1.3.3. Explosion oxydative .....	35
1.3.4. NETose ou production des Neutrophil Extracellular Traps (NETs) .....	38
1.3.5. Autophagie.....	39
1.4. Médiateurs générés par les PN au cours de l'inflammation .....	40
1.4.1. Médiateurs peptidiques: les cytokines et les chimiokines .....	40
1.4.2. Médiateurs lipidiques : les prostaglandines et les leucotriènes.....	43
1.5. Rôles des PN dans la résolution de l'inflammation .....	44
1.5.1. Phase de pro-résolution : l'apoptose.....	44
1.5.2. Phase anti-inflammatoire .....	47
1.5.3. Phase de reconstitution tissulaire .....	50
1.6. Sous-populations fonctionnelles de PN .....	52
Chapitre 2 : Les Neutrophil Extracellular Traps .....	55
2.1. Historique de la NETose .....	57

2.2. Structure et composition des NETs .....	58
2.3. Mécanisme de la NETose .....	60
2.4. ETosis : La libération extracellulaire d'ADN par d'autres types cellulaires	67
2.4.1. Eosinophiles .....	67
2.4.2. Basophiles .....	67
2.4.3. Mastocytes .....	68
2.4.4. Monocytes / Macrophages .....	68
2.5. NETose dans le règne animal et végétal .....	69
2.6. Effets microbicides des NETs .....	70
2.6.1. Bactéries .....	71
2.6.2. Parasites .....	73
2.6.3. Levures et champignons .....	74
2.6.4. Virus .....	75
2.6.5. Stratégie pour échapper à l'action des NETs .....	75
2.6.6. Controverses autour de l'effet microbicide NETs .....	77
2.7. Implication des NETs dans la physiopathologie des maladies .....	77
2.7.1. Effets néfastes dus à la cytotoxicité directe des NETs .....	79
2.7.2. Implication des NETs dans les maladies thrombotiques .....	80
2.7.3. Rôle des NETs dans le cancer .....	82
2.7.4. Rôle des NETs dans l'athérosclérose .....	83
2.7.5. Rôle des NETs dans les atteintes pulmonaires .....	84
2.7.5.1. <i>La mucoviscidose</i> .....	84
2.7.5.2. <i>L'ALI et SDRA</i> .....	85
2.7.5.3. <i>L'asthme</i> .....	86
2.7.6. Rôle des NETs dans les maladies auto-immunes .....	86
2.7.6.1. <i>Les vascularites auto-immunes</i> .....	87

2.7.6.2. <i>Le lupus érythémateux systémique</i> .....	87
2.7.6.5. <i>Le psoriasis</i> .....	89
2.7.6.4. <i>La polyarthrite rhumatoïde</i> .....	90
2.8. NETs comme cible thérapeutique .....	91
2.9. Les mystères non dévoilés de la NETose .....	92
Chapitre 3 : Les cellules dendritiques .....	94
3.1. Classification des cellules dendritiques.....	97
3.1.2. Les cellules dendritiques myéloïdes.....	98
3.1.2.1 <i>mDC-CD1c<sup>+</sup></i> .....	99
3.1.2.2. <i>mDC-CD141<sup>high</sup></i> .....	99
3.1.3. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes .....	100
3.1.4. Les cellules de Langerhans .....	101
3.1.5. Les cellules dendritiques CD14.....	101
3.2. Les cellules dendritiques différenciées à partir des monocytes .....	102
3.2.1. Les DC inflammatoires.....	102
3.2.2. Les SLAN-DC .....	103
3.3. Ontogénie des cellules dendritiques .....	103
3.4. Obtention des cellules dendritiques <i>in vitro</i> .....	105
3.4.1. A partir de cellules souches CD34 <sup>+</sup> .....	105
3.4.2. A partir de monocytes .....	106
3.5. Rôle des cellules dendritiques .....	106
3.5.1. Capture de l'Ag .....	107
3.5.2. Apprêtement de l'Ag.....	109
3.5.2.1. <i>Voie d'apprêtement des Ag endogènes</i> .....	109
3.5.2.2. <i>Voie d'apprêtement des Ag exogènes</i> .....	109
3.5.2.3. <i>Présentation croisée</i> .....	110
3.5.2.4. <i>Présentation des Ag lipidiques : les molécules CD1</i> .....	111

3.5.2.5. Implication de Nox2 dans l'apprêtement et la présentation des Ag.....	111
3.5.3. Maturation .....	113
3.5.4. Migration .....	114
3.5.5. Activation des lymphocytes T .....	115
3.6. Orientation de la réponse immunitaire .....	116
3.7. Implication des voies de signalisation dans la maturation des DC .....	119
3.7.1. Activation des voies de signalisation communes aux TLR.....	119
3.7.1.1. Voie dépendante de Myd88 .....	119
3.7.1.2. Voie indépendante de Myd88 .....	120
3.7.2. Activation des voies de signalisation par les récepteurs au TNF.....	121
3.7.3. Voie NFκB .....	122
3.7.4. Voie des MAPK .....	124
3.7.4.1.....	125
p38MAPK.....	125
3.7.4.2. ERK.....	125
3.7.4.3. JNK .....	126
3.7.5. Voie PI3K .....	126
<b>Chapitre 4 : L'interaction entre les PN et les DC .....</b>	<b>129</b>
4.1. La migration dirigée des PN et des DC vers le site inflammatoire.....	131
4.2. Les interactions PN-DC induisent des modulations fonctionnelles.....	133
4.2.1. Les PN régulent la maturation et l'activation des DC .....	133
4.2.2. Les DC régulent la survie et l'activation des PN.....	137
4.3. L'état des PN peut influencer la modulation des DC .....	137
4.3.1. NETs et pDC .....	139
4.3.2. NETs et DC myéloïdes.....	139

4.4. Un trio cellulaire : la communication entre les DC et les PN peut moduler la réponse lymphocytaire .....	140
Objectif du travail .....	144
Méthodes .....	147
5.1 Isolement des polynucléaires neutrophiles sanguins humains (PN).....	149
5.2 Libération de NETs (le PMA ou à l'ionophore calcique A23187) .....	149
5.3 Observation des NETs par immunofluorescence .....	149
5.4 Comparaisons des différentes nucléases.....	150
5.5 Isolement des NETs .....	150
5.6 Observation et quantification de l'ADN des NETs isolés .....	151
5.7. Observation et quantification des protéines (H3, H3cit et LF).....	152
5.8 Quantification de l'activité ELA des NETs isolés .....	152
5.9 Test de reproductibilité .....	153
5.10 Quantification du pouvoir bactéricide des NETs isolés.....	153
5.11 Différenciation <i>in vitro</i> de moDC humains purifiés .....	154
5.12 Induction de la maturation des moDC et effet modulateur des NETs ...	154
5.13 Immunophénotypage des moDC après maturation .....	155
5.14 Dosage des cytokines libérées par les moDC pendant la maturation...	155
5.15 Test de dégradation du TNF $\alpha$ par les NETs .....	156
5.16 Analyse des transcrits de cytokines par qPCR dans les moDC.....	157
5.17 Etude de la translocation de la sous-unité NF $\kappa$ B p65 dans le noyau au cours de la maturation des moDC .....	158
5.18 Test de prolifération des LyT CD4 <sup>+</sup> en réponse aux moDC .....	159
5.19 Analyse des transcrits des gènes effecteurs et tolérogènes par PCR quantitative (qPCR) dans les moDC.....	160
5.20 Polarisation des LyT CD4 <sup>+</sup> naïfs en réponse aux moDC .....	160
Article 1 .....	163

Article 2 .....	179
Discussion .....	229
Conclusion et perspectives .....	239
Bibliographie .....	247
Annexes .....	287

# Figures

Figure 1. Granulopoïèse.....	21
Figure 2. Cascade classique de recrutement des PN.....	23
Figure 3. Voies de signalisation engagées par les PRR dans les PN.....	25
Figure 4. Récepteurs humains des IgG.....	29
Figure 5. Phagosome des PN.....	31
Figure 6. Granulations des PN.....	33
Figure 7. Activation de l'explosion oxydative par Nox2.....	36
Figure 8. Métabolisme des FRO et réactivités comparées.....	37
Figure 9. Neutrophil Extracellular Traps.....	38
Figure 10. Voie de l'autophagie.....	39
Figure 11. Profil des cytokines pouvant être libérées par les PN activés.....	41
Figure 12. Implication des PN dans la phase pro-résolutive de l'inflammation.....	47
Figure 13. Rôle des PN dans la phase anti-inflammatoire.....	48
Figure 14. Interactions entre les PN et les cellules des tissus inflammatoires et des ganglions lymphatiques.....	53
Figure 15. Morphologie des PN libérant des NET.....	58
Figure 16. Analyse des NETs par MEB à haute résolution.....	59
Figure 17. Immuno-marquage des protéines présentes sur les NETs.....	60
Figure 18. Libération des NETs par les PN activés.....	62
Figure 19. Représentation schématique des processus moléculaires de la NETose.....	65
Figure 20. Libération des NETs sans mort cellulaire associée.....	66
Figure 21. Micro-organismes infectieux piégés par les NETs.....	70
Figure 22. Rôle des NETs dans les maladies inflammatoires.....	78
Figure 23. Rôle des NETs au cours du sepsis.....	80
Figure 24. NETs et le développement de la thrombose veineuse profonde.....	81
Figure 25. Rôle NETs dans la progression tumorale.....	82
Figure 26. Aperçu des principales données et hypothèses sur le rôle des NETs dans la physiopathologie du LES.....	89
Figure 27. Principaux marqueurs de surface des populations de DC chez l'homme et leurs homologues chez la souris.....	98
Figure 28. Régulation de l'ontogénie des DC murines et humaines.....	105
Figure 29. Représentation schématique de la fonction des DC.....	107
Figure 30. Apprêtement des Ag et présentation via les CMH.....	108

Figure 31. Rôle de Nox2 et de FRO dans la présentation antigénique dans les DC ....	112
Figure 32. Maturation des DC.....	114
Figure 33. Polarisation T en fonction des cytokines secrétées par les DC.....	117
Figure 34. Voies des signalisations activées dans les DC par les TLR.....	121
Figure 35. Schéma de la signalisation initiée par TNFR1 et TNFR2.....	122
Figure 36. Voie de signalisation NFkB.....	123
Figure 37. Voie de signalisation MAPK.....	124
Figure 38. Régulation négative de la signalisation TLR par la PI3K dans les cellules immunitaires innées.....	127
Figure 39. Chimiotactisme croisé des PN et des DC.....	132
Figure 40. Modulation de l'activation des DC par les PN.....	136
Figure 41. Etat des PN module de manière différentielle l'activation des DC.....	138
Figure 42. Protocole d'isolement des NETs.....	151
Figure 43. Différentiation, traitement par le LPS et/ou les NETs et analyse des moDC.	154
Figure 44. Etude de la capacité des moDC à induire la prolifération des LyT.....	159
Figure 45. Conclusion.....	246

# Tableaux

Tableau 1. PRR exprimés par les PN.....	27
Tableau 2. Comparaison de la phagocytose dans les PN et les macrophages.....	30
Tableau 3. Protéines des NETs identifiées à ce jour.....	61
Tableau 4. Liste des bactéries piégées et/ou tuées par les ETs.....	72
Tableau 5. Liste des protozoaires piégés et/ou tués par les NETs.....	73
Tableau 6. Caractéristiques des anticorps utilisés pour le phénotypage des DC.....	155
Tableau 7. Liste des amorces utilisées pour l'analyse des transcrits par PCR.....	158



# *Abréviations*



---

AA	Acide arachidonique
ADNdb	ADN double brin
Akt/PKB	Protéine kinase B
ANCA	Anti-neutrophil cytoplasmatic antibodies
AnxA1	Annexine A1
AP-1	Activator protein 1
ARE	Adénine/uridine-rich element
BAFF/BLYS	Facteur activateur des cellules B
BCAP	B-cell adaptator for PI3K
BET	Bromure d'éthidium
B2-intégrine	CD11b
BLT1 / BLT2	Leukotriène B (4) récepteurs
BPI	Bactéricide/perméabilité-incrémentant protéine
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
CATC	Cathepsine C
CATG	Cathepsine G
CBA	Cytométrique bead array
CDK	kinases cycline-dépendantes
CDP	Progéniteur lymphoïde commun
C/EBP $\alpha$	CCAAT enhancer-binding alpha
C/EBP $\epsilon$	CCAAT enhancer-binding epsilon
CFSE	Carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane regulator
CGD	Granulomatose septique familiale
CLA	Cutaneous leucocyte-associated
CLEC-6	C-type lectin domain family 1 member-6
CLIP	Class II associated invariant chain peptide
CLR	Récepteurs de la lectine de type C
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX	Cyclooxygénase
CPA	Cellules présentatrices d'antigène
CR	Récepteurs du complément

## *Abréviations*

---

CXCL8	IL-8
CXCL12 (SDF1 $\alpha$ )	Stomal Cell-Derived Factor 1 $\alpha$
DAMP	Motifs moléculaires associés aux dégâts
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DC	Dendritic cell
DCIR	Dendritic cell immunoreceptor
DCML	DC, monocyte, B and NK lymphoid deficiency
DD	Death domain
DPI	Diphenyl iodonium
ELA	Elastase
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ESL-1	E-selectin ligand-1
ETs	Extracellular Traps
Fc	Fragment Fc (cristallisable)
FcyR	Récepteurs pour le fragment Fc des IgG
FG	Granules de ficollines
fMLP	formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine
FPR	Formyl peptide receptors
FRO	Formes réactives de l'oxygène
GA	Granulations azurophiles
GAS	<i>Streptococcus pyogenes</i> du groupe A
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
G-CSFR	Granulocyte colony stimulating factor receptor
GFI-1	Growth factor independent transcription repressor
GILZ	Glucocorticoid Induced Leucine Zipper
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GMP	Progéniteur commun des granulocytes et des macrophages
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPx	Glutathion peroxydase
GS	Granulations spécifiques

---

HBSS	Hank's buffered salt solution
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF-1 $\alpha$	Facteur induit par l'hypoxie 1 $\alpha$
HIN-200	Hematopoietic IFN-inducible nuclear antigens with 200 amino acid repeats proteins
HMGB1	Hight-mobility group protein B1
HMG-CoA	3-hydroxy 3-méthylglutaryl coenzyme A
HSC	Cellules souches hématopoïétiques (hematopoietic stem cells)
H3	Histone 3
H3cit	H3 citrullinée
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54)
IDEC	DC inflammatoires épidermiques
ILT7	Immunoglobulin-like transcript 7
INF $\gamma$	Interferon gamma
IRAK	Interleukin-1 receptor associated kinase
IRF	Interferon Regulatory Factor
LC	Cellules de Langerhans
LDG	Low-density granulocytes
LES	Lupus érythémateux systémique
LF	Lactoferrine
LL37	Cathelicidine
LOX-1	lectin-like oxidized LDL receptor-1
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine rich repeat
LTB4	Leucotriène B4
LXA4	Lipoxine A4
LyT	Lymphocytes T
Mac-1	$\beta$ 2-intégrine ( $\alpha$ M $\beta$ 2)
Mcl-1	Myeloid cell leukaemia-1
mDC	DC myeloïde
MDP	Progéniteur commun spécifique des macrophages et des DC

## *Abréviations*

---

MEB/SEM	Microscopie électronique à balayage
MIP-3 $\alpha$	Macrophage Inflammatory Protein-3 (CCL20)
miRNA	microRNA
MLP	Progéniteur lymphoïde multipotent
MMP	Matrix metalloproteinases
MNDA	Myeloid cell nuclear differentiation antigen
MPO	Myéloperoxydase
MyD88	Myeloid differentiation primary response protein 88
MZ	Zone marginale
NADPH-oxydase	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxidase
N <sub>BH</sub>	Neutrophiles auxiliaires des cellules B
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NF $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B
NLR	NOD-like receptors
NO	Monoxyde d'azote
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
PAD4	Peptidyl arginine déiminase 4
PAF	Platelet Activating Factor
PAMP	Pathogen associated molecular patterns
PBMC	Cellules mononucléées
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
pDC	DC plasmacytoïdes
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31)
PFA	Paraformaldéhyde
PG	Prostanoïdes
PGE2	Prostaglandine E2
PI3K	Phosphatidyl inositol 3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PN	Polynucléaires neutrophiles
PRR	Pattern recognition receptors

---

PR3	Protéinase 3
PSGL1	P-selectin glycoprotein ligand 1
PTU	Propylthiouracil
PU.1	Transcription factor PU.1 (ou SPI-1)
RALDH1	Retinaldehyde dehydrogenase 1
rhDNase	DNase recombinante humaine
R848	Imidazoquinoline
RLH	RIG-like helicases
RvE1	Resolvin E1
SLAN	Antigène 6-sulfo LacNAc
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
SP	Protéines surfactants
STAB1	Stabilin-1
SVF	Sérum de veau foetal
TAN	Tumor associated neutrophils
TAP	Transporter associated with antigen processing
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TLR	Toll like receptors
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TREM	Triggering receptors expressed on myeloid cells
TXA2	Tromboxane A2
UFC	Unités formant colonies
VAMP	Vesicle-associated membrane proteins
VE-cadhérine	Molécule d'adhérence endothéliale
VEGF-A	Facteur de croissance endothélial vasculaire A

## *Abréviations*

---

VIH1	Virus de l'immunodéficience humaine 1
VS	Vésicules sécrétoires

*Avant-propos*



Le **système immunitaire** est constitué d'un ensemble complexe d'organes individualisés et de tissus entre lesquels circulent des cellules immunocompétentes. Ce réseau de communication confère au système immunitaire trois propriétés essentielles : 1) une importante capacité d'échanges d'informations, par des contacts cellulaires ou par la libération de médiateurs solubles ; 2) une régulation fine permettant de préserver en permanence un équilibre et une réponse adaptée ; 3) un rôle effecteur performant capable de protéger l'intégrité de l'organisme. La perturbation de l'une de ces propriétés est à l'origine d'états pathologiques comme des déficits immunitaires, des maladies auto-immunes ou des états d'hypersensibilité.

Les **polynucléaires neutrophiles** (PN) sont les cellules phagocytaires professionnelles du système immunitaire inné qui agissent comme première ligne de défense contre les agents infectieux mais participent également à la régulation de l'immunité adaptative. Leurs propriétés fonctionnelles sont nombreuses parmi lesquelles la phagocytose, la libération de cytokines, d'enzymes et de peptides microbicides stockés dans leurs granulations cytoplasmiques, la production de formes réactives de l'oxygène (FRO) grâce à l'explosion oxydative et la formation des « Neutrophil Extracellular Traps » (NETs).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à cette dernière propriété des PN décrite en 2004 par l'équipe d'Arturo Zychlinsky, la NETose. Les NETs sont des filaments de chromatine associés à des protéines nucléaires, cytoplasmiques et granulaires, issus des PN activés. Leur formation nécessite la production de FRO, l'activation de l'autophagie et la décondensation de la chromatine. Cette dernière fait suite à la citrullination des histones par l'enzyme PAD4 (peptidylarginine deiminase 4) et à leur protéolyse après translocation nucléaire de protéases. Puis la désintégration de la membrane nucléaire permet à la chromatine de fixer différentes protéines cytoplasmiques et granulaires parmi lesquelles des enzymes et des molécules microbicides. L'étape finale consiste en l'expulsion de la chromatine dans le milieu extracellulaire libérant les NETs.

Initialement, ces **NETs** ont été définis comme de simples pièges à micro-organismes capables de les tuer grâce à une concentration locale importante en composants antimicrobiens. Plus récemment, il a été démontré que les NETs

participaient aussi aux dommages tissulaires au cours de maladies inflammatoires (sepsis, asthme, thrombose...), que certains de leurs composants étaient à l'origine du développement de maladies auto-immunes (ADN/LL37 pour le lupus, protéinase 3 pour les vascularites, par exemple) et que leur implication au cours du cancer était probable. Il semble donc que le rôle des NETs dans la physiopathologie des maladies inflammatoires, auto-immunes et allergiques en particulier soit majeur et représente un nouveau champ d'investigation.

La découverte des NETs et la description croissante de leurs propriétés renforcent le rôle clé des PN dans la réponse immunitaire innée mais aussi adaptative. En effet, il est maintenant clair que la fonction des PN va bien au-delà de celle de phagocyter et détruire les agents infectieux. On sait par exemple qu'ils jouent un rôle dans le remaniement tissulaire lors de l'inflammation car ils sont capables d'orchestrer la réparation des lésions à la fin de la phase aiguë en régulant leurs propres fonctions, en induisant leur apoptose et en programmant les macrophages afin d'accélérer la réparation tissulaire. De la même manière, les **PN participent à la régulation de l'immunité adaptative**, par interaction directe avec les lymphocytes T (LyT) et lymphocytes B (LyB) ou indirectement par la modulation des cellules dendritiques (DC).

Les DC font partie des cellules sentinelles du système immunitaire et sont les seules cellules présentatrices d'antigènes (CPA) capables d'activer une réponse lymphocytaire T primaire. Dans les tissus, les DC présentent un phénotype dit immature. Face à des signaux de danger, les DC acquièrent un phénotype mature, migrent vers les ganglions lymphatiques, et activent une réponse T spécifique.

Les **interactions entre les DC et les PN** ont été rapportées ces dernières années et constituent un nouveau domaine d'intérêt où immunité innée et immunité adaptative coopèrent. Les PN et les DC peuvent s'attirer mutuellement sur le site inflammatoire grâce aux chimiokines. Les PN peuvent aussi moduler la maturation et l'activation des DC par certaines interactions cellulaires (Mac-1/CEACAM et DC-SIGN par exemple), la production de médiateurs tels que le TNF $\alpha$ , des alarmines, des protéines granulaires ou encore par la libération de microparticules ou ectosomes. Les modifications du phénotype des DC ont ensuite des répercussions sur la prolifération lymphocytaire T et la qualité de cette réponse.

Dans ce contexte d'interactions entre les **PN** et les **DC**, les **NETs** pourraient jouer un rôle important dans la modulation fonctionnelle des DC lors d'une inflammation mais ce mécanisme n'a jamais été démontré à ce jour. Les nombreux composants exprimés par les NETs (protéines et acides nucléiques) pourraient interagir directement ou indirectement avec leurs récepteurs ou d'autres structures sur les DC, activer les voies de signalisation et moduler ainsi la fonction et l'activation des LyT.

Dans ce travail de thèse, nous faisons donc l'**hypothèse** que les NETs produits sur le site inflammatoire peuvent moduler la maturation des DC et la réponse lymphocytaire T, assurant ainsi un pont supplémentaire entre immunité innée et immunité adaptative. La première étape de ce travail a consisté en la mise au point d'un protocole standardisé de production de NETs à partir de PN humains ; puis cet outil biologique a permis d'analyser l'effet des NETs sur la maturation et les fonctions de DC humaines d'origine monocyttaire.

Dans ce document une introduction bibliographique présente en premier lieu les deux types cellulaires étudiés, les PN (en particulier le phénomène de NETose) et les DC. La partie suivante traite des données actuelles sur la régulation des DC par les PN et introduit le rôle des NETs dans ce contexte.



# *Introduction*



*Chapitre 1 :*  
*Les polynucléaires neutrophiles*



Les polynucléaires neutrophiles (PN) sont les leucocytes les plus abondants dans la circulation sanguine et représentent environ 70% de la population leucocytaire circulante. Ils ont été décrits par Paul Ehrlich en 1880, grâce à des techniques de coloration. Le terme neutrophile reflète la possibilité de marquer ces leucocytes simultanément avec des colorants acides et basiques, produisant ainsi une coloration neutre. (Amulic et al., 2012)

Les PN sont les principaux effecteurs de la réponse immunitaire innée car ils sont les premiers leucocytes présents au niveau du site inflammatoire et sont capables de phagocyter et dégrader un large éventail de pathogènes. Néanmoins, durant les deux dernières décennies, de nombreux travaux ont décrit de nouveaux aspects de la biologie des PN démontrant que leurs rôles vont bien au-delà des mécanismes microbicides initialement mis en exergue (Cassatella, 2013; Mocsai, 2013). Par exemple, les PN peuvent survivre longtemps ; ils ont la capacité d'exprimer des gènes codant pour les médiateurs inflammatoires clés (composants du complément, récepteurs pour les fragments Fc des immunoglobulines, chimiokines et cytokines...). De plus, les PN peuvent produire des molécules anti-inflammatoires et des facteurs qui favorisent la résolution de l'inflammation. Les PN peuvent donc contribuer significativement à la régulation de nombreux processus inflammatoires et, ainsi, agir comme éléments clés des interactions cellulaires. (Jaillon et al., 2013)

### **1.1. Ontogenèse, différenciation et maturation**

La granulopoïèse est un processus étroitement régulé qui commence par la différenciation des cellules souches pluripotentes en progéniteurs myéloïdes primitifs qui, à leur tour, se différencient en précurseurs myéloïdes spécifiques. Au cours de ce processus, les cellules souches hématopoïétiques (hematopoietic stem cells, HSC) se différencient en myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte, « band » PN, puis en PN segmenté au noyau polylobé. Ce processus prend environ 14 jours ; la division cellulaire est interrompue au stade de métamyélocyte, tandis que la différenciation des granulations se poursuit. (Borregaard, 2010)

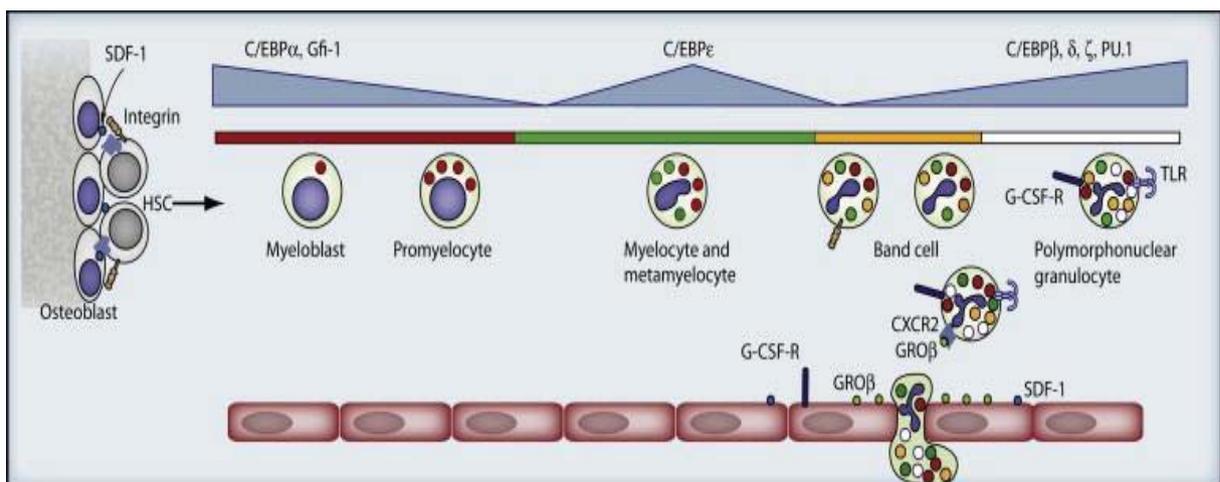
Parmi les facteurs extracellulaires qui dirigent la progression des HSC en PN, le G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor) joue un rôle essentiel. Le G-CSF a la capacité d'induire la différenciation myéloïde, de stimuler la prolifération des précurseurs granulocytaires et d'induire la libération des PN de la moelle osseuse. Les

effets biologiques du G-CSF sont médiés *via* son récepteur G-CSFR ou CD114, membre de la famille des récepteurs de cytokines hématopoïétiques. D'autres cytokines hématopoïétiques contribuent au développement des PN *in vivo* incluant le GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor), l'IL-6 et l'IL-3 (Borregaard, 2010). L'expression coordonnée et complexe de plusieurs facteurs de transcription myéloïdes (C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\epsilon$  (CCAAT-enhancer-binding proteins), PU.1, et GFI-1) est nécessaire à la régulation de ce processus. L'engagement du progéniteur myéloïde vers la granulopoïèse est déterminé par un équilibre entre les facteurs de transcription C/EBP $\alpha$  et PU.1 ; tandis que C/EBP $\alpha$  permet préférentiellement la différenciation en PN, une forte expression de PU.1 favorise la différenciation en monocyte (Borregaard, 2010). C/EBP $\alpha$  est donc actif pendant toute la différenciation granulocytaire et participe à l'activation de la transcription des gènes permettant l'expression de la myéloperoxydase (MPO) et du récepteur au G-CSF par exemple (Keeshan et al., 2003). De plus, durant cette étape, le facteur de transcription GFI-1 joue aussi un rôle important dans l'engagement et la progression de la granulopoïèse ; en effet, il va limiter la prolifération des cellules souches et inhiber la transcription des gènes impliqués dans la différenciation monocyttaire (Horman et al., 2009). Par la suite, l'expression de C/EBP $\epsilon$  est augmentée par le C/EBP $\alpha$  et par le G-CSF permettant la formation des granulations spécifiques et la différenciation terminale des PN. Alors que le passage du myéloblaste au promyélocyte est sous la dépendance de C/EBP $\alpha$  et GFI-1, le passage du promyélocyte au PN est régulé principalement par C/EBP $\epsilon$ . Même si au départ l'expression de PU.1 est inhibée, elle augmente au cours de la différenciation. Ce facteur est capable de réguler l'expression de plusieurs gènes clés dans la fonction du PN comme la  $\beta$ 2-intégrine, le CD45, le récepteur du G-CSF et plusieurs composants du complexe de la NADPH-oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxidase) (Borregaard, 2010). De plus, PU.1 participe au mécanisme de protection du PN *via* la régulation de l'expression de la glutathion peroxydase (GPx) et du SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) (Throm and Klemsz, 2003). L'ensemble de ces étapes est résumé dans la Figure 1.

La libération des PN matures dans la circulation sanguine dépend ensuite des médiateurs présents dans leur microenvironnement et l'homéostasie cellulaire est régulée par deux récepteurs de chimiokines majeurs CXCR2 et CXCR4. Les PN générés et stockés à l'intérieur de la moelle osseuse présentent des niveaux

d'expression élevés de CXCR2 et peuvent être efficacement mobilisés par des ligands spécifiques tels que CXCL1 (KC chez la souris / Gro- $\alpha$  chez l'homme) ou CXCL8 (IL-8). A l'inverse, CXCR4 sert de facteur de rétention *via* son ligand CXCL12 (SDF1 $\alpha$ ) qui est exprimé de façon constitutive dans la moelle osseuse (Eash et al., 2010). Après leur libération dans la circulation sanguine, les PN deviennent sénescents et l'expression de CXCR4 augmente alors que l'expression de CXCR2 diminue. Les PN-CXCR4<sup>high</sup> meurent par apoptose ou bien retournent vers la moelle osseuse où ils sont phagocytés par les macrophages (Martin et al., 2003). La phagocytose des PN apoptotiques par les macrophages tissulaires est également un mécanisme important qui permet la régulation du nombre de PN dans l'organisme. Durant ce processus, les macrophages ne produisent plus d'IL-23, inhibant ainsi la production d'IL-17 par les cellules Th17, la diminution du G-CSF et, par conséquent, le développement et la libération des PN. Cette boucle complexe de régulation permet de maintenir le nombre de PN circulants et tissulaires relativement constant (Stark et al., 2005).

Dans les conditions physiologiques, les PN se trouvent dans la moelle osseuse ou en circulation, mais ils sont aussi localisés dans la rate, le foie et les poumons grâce à des mécanismes non encore élucidés. Il est possible que ces organes soient des réservoirs de PN matures, qui peuvent être rapidement déployés vers les sites d'inflammation ou d'infection. Il est également possible que les PN stockés dans ces organes aient un rôle protecteur, de patrouille constante à la recherche de lésions tissulaires ou invasion microbienne (Summers et al., 2010).



**Figure 1. Granulopoïèse.** Les PN ont pour origine les HSC de la moelle osseuse. Leur formation débute par la stimulation du précurseur myéloïde par le facteur de croissance G-CSF et un équilibre entre les facteurs de transcription C/EBP $\alpha$  et PU.1. Cette différenciation passe par plusieurs étapes : myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte et finalement le PN mature. D'après Borregaard. Immunity 2010.

Les poumons semblent être particulièrement riches en PN matures. Certains auteurs l'expliquent par une séquestration temporaire liée au débit cardiaque. Cependant, le temps de persistance des PN dans les poumons est beaucoup plus long que le temps de transit moyen estimé dans d'autres organes, comme le foie, la rate ou la moelle osseuse. (Kolaczkowska and Kubes, 2013; Kreisel et al., 2010)

### 1.2. Migration

Sous l'influence de différents *stimuli* provenant du foyer infectieux ou inflammatoire, les PN, cellules physiologiquement au repos dans le sang circulant, adhèrent aux cellules endothéliales puis traversent cette barrière pour se diriger de façon orientée vers leur cible au niveau tissulaire. Ce phénomène de migration trans-endothéliale fait intervenir une série d'évènements régulés de façon complexe (Kolaczkowska and Kubes, 2013). (Figure 2)

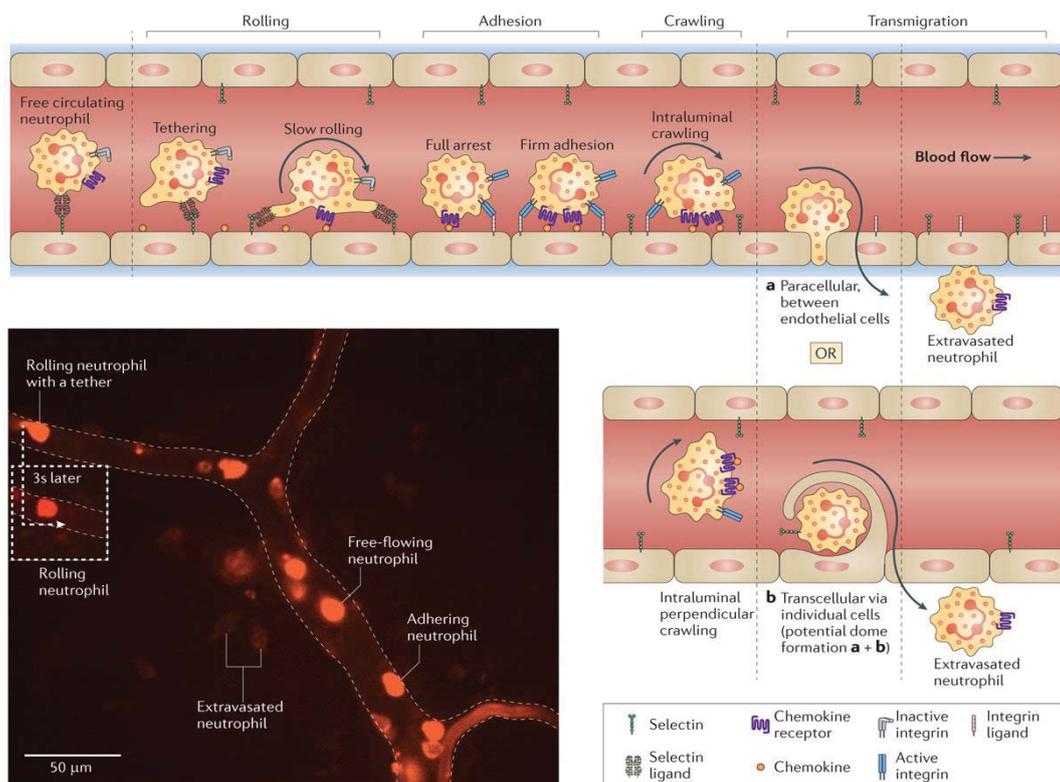
Le PN va d'abord adhérer de façon transitoire aux cellules endothéliales par l'intermédiaire de molécules d'adhérence appartenant à la famille des sélectines. En effet, le PN exprime à sa surface, de façon constitutive, l'E-selectin ligand-1 (ESL-1), le CD44, la L-sélectine (CD62L), la P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL1) et d'autres ligands glycosylés, qui se lient à des E- et P-sélectines, présentes à la surface des cellules endothéliales et dont l'expression est augmentée par différents médiateurs provenant du foyer inflammatoire comme l'IL-1, le LPS (lipopolysaccharide) ou le TNF $\alpha$ . Ces interactions, de faible affinité, induisent des étapes successives d'attachement et de détachement du PN sur la cellule endothéliale qui sont les premières étapes de la cascade de recrutement des leucocytes. Ceci correspond au phénomène de roulement ou «rolling» du PN le long de l'endothélium. (Zarbock et al., 2011)

Ensuite, des récepteurs couplés aux protéines G sur ces PN se lient à des chimiokines séquestrés sur l'endothélium, ce qui entraîne à des signaux «inside-out» induisant des changements conformationnels des  $\beta$ 2-intégrines exprimées par les PN et l'augmentation de leur expression. La  $\beta$ 2-intégrine CD11b-CD18 (Mac-1 ou  $\alpha$ M $\beta$ 2) est cruciale pour le ralentissement intravasculaire des PN, nécessaire à leur transmigration (Phillipson et al., 2006).

Les PN traversent l'endothélium en utilisant deux voies non mutuellement exclusives. La migration trans-cellulaire (au travers des cellules endothéliales) est

utilisée par 5-20% des PN ; cette voie induit la translocation d'ICAM-1 dans les régions riches en actine et cavéoline, créant une organelle vesiculo-vacuolaire qui forme un canal intracellulaire au travers duquel le PN peut traverser la cellule. La migration paracellulaire (entre les cellules endothéliales) est plus fréquente et fait intervenir plusieurs interactions entre les  $\beta 2$ -intégrines et des molécules d'adhérence endothéliales telles qu'ICAM-1 et -2, PECAM-1, la VE-cadhérine et le CD99. (Dimasi et al., 2013)

Après avoir traversé la barrière endothéliale, les PN migrent dans les tissus vers le site inflammatoire ou infectieux. Cette migration s'effectue de façon orientée, selon un gradient de substances chimio-attractantes, dont des dérivés bactériens tels que les N-formyl-peptides (en particulier le formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine : fMLP), des dérivés du complément comme le C5a, des dérivés lipidiques tels que le leucotriène B4 (LTB4) et le Platelet Activating Factor (PAF), ou des chimiokines dont le prototype est l'IL-8 pour le PN (Kolaczkowska and Kubes, 2013).



**Figure 2. Cascade classique de recrutement des PN.** Toutes les étapes successives de recrutement des PN sont schématisées, du vaisseau vers les tissus. Les deux mécanismes possibles de transmigration connus sont indiqués: a) la migration para-cellulaire, entre les cellules endothéliales ; et b) trans-cellulaire, à travers les cellules endothéliales. L'image de microscopie intravitale montre une veinule post-capillaire de la peau d'une souris contenant des PN (cellules LY6G<sup>+</sup>) marqués avec un anticorps conjugué à la PE (en rouge). La peau de souris a été infectée par *S. aureus* et l'image a été prise 2 heures plus tard. D'après Kolaczkowska and Kubes, Nat Rev Immunol 2013

### **1.2.1. Inversion de la migration**

Au cours de l'inflammation, la plupart des PN meurent dans les tissus et sont phagocytés par les macrophages. Cependant, certains travaux suggèrent que les PN extravasés pourraient réintégrer le système vasculaire. Cela a été démontré chez le poisson-zèbre, au cours d'une réponse inflammatoire stérile (Elks et al., 2011). Des observations similaires ont été effectuées chez la souris, en lien avec la diminution d'expression de JAMC, une protéine d'adhérence (Woodfin et al., 2011). Par ailleurs, un autre groupe a décrit, chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, la présence d'une population minoritaire (1-2%) de PN qui réintègre la circulation, plus résistante à l'apoptose (Buckley et al., 2006). La finalité de ce mécanisme d'inversion de la transmigration n'est pas connue. Cela pourrait être un moyen de préserver les PN en l'absence d'infection. Cependant, il est également possible que les cellules qui réintègrent la circulation puissent ainsi aller vers d'autres organes, menant éventuellement à des dommages tissulaires et une inflammation systémique et/ou chronique (Kolaczkowska and Kubes, 2013).

### **1.2.2. Mécanismes originaux**

L'amélioration de la microscopie intravitale a révélé que la cascade de recrutement des PN n'est pas uniforme. Dans divers organes comme le foie, le cerveau ou les poumons, certaines étapes de la cascade ne sont pas présentes, et des molécules d'adhérence originales sont utilisées (Megens et al., 2011).

Dans le cas du foie, le recrutement des PN dans les veinules portes et centrales se fait de manière classique, mais les PN recrutés dans les capillaires sinusoidaux adhèrent directement à l'endothélium hépatique sans passer par l'étape de roulement. Cette adhérence aux sinusoides dépend du contexte ; tandis que dans une inflammation stérile l'interaction MAC1-ICAM1 est nécessaire, au cours des infections, des interactions entre l'acide hyaluronique et le CD44 sont observées sous la dépendance de l'IL-10 (McDonald et al., 2008; Menezes et al., 2009).

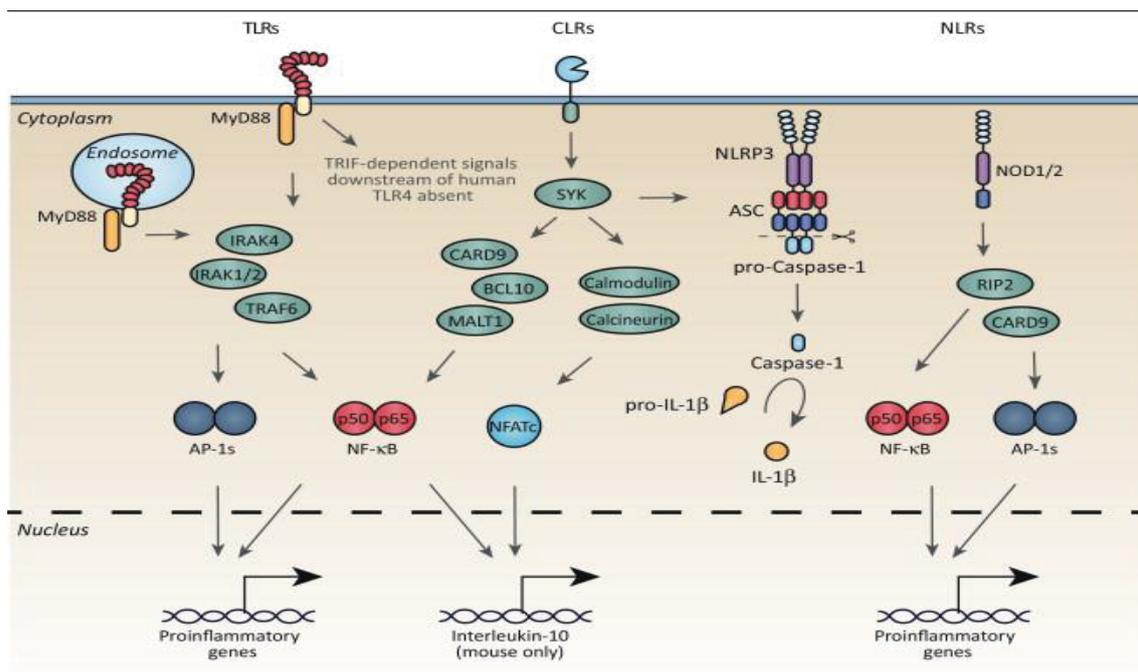
Au niveau pulmonaire, la microcirculation est composée d'un réseau de fins capillaires, nécessitant une déformation particulièrement importante des PN pour leur migration. La séquestration des PN dans les poumons serait ainsi due à un piège mécanique qui contournerait la nécessité des sélectines et des intégrines. En effet, même en l'absence de ligands de ces molécules d'adhérence, les PN adhèrent aux

vaisseaux sanguins pulmonaires ; l'implication d'autres molécules d'adhérence n'est pas exclue non plus (Looney et al., 2011). Des études de microscopie intravital dans le poumon pourront clarifier ces questions.

Dans le cerveau, des plaquettes adhérentes à l'endothélium pourraient servir de pont entre les cellules endothéliales et les PN. La P-sélectine est beaucoup plus fortement exprimée sur les plaquettes que les cellules endothéliales, favorisant ainsi le recrutement des PN dans un environnement à haut cisaillement (Carvalho-Tavares et al., 2000).

### 1.3. Reconnaissance et élimination des agents pathogènes par les PN

Arrivé sur le site inflammatoire, le PN va reconnaître l'agent pathogène grâce aux différents récepteurs présents à sa surface, les PRR (pattern recognition receptors). Les principaux types de PRR sont: les TLR (Toll like receptors), les CLR (récepteurs de la lectine de type C) et les NLR (NOD like receptors) (Thomas and Schroder, 2013). (Figure 3)



**Figure 3. Voies de signalisation engagées par les PRR dans les PN.** Représentation de l'expression des gènes et de la production de cytokines après activation des voies de signalisation des PRR. Ces voies contrôlent également d'autres mécanismes des PN, comme la phagocytose, la dégranulation, la production de formes réactives de l'oxygène et la survie. D'après Thomas et al. Trends Immunol 2013

Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I comprenant un domaine extracellulaire riche en leucines (domaine LRR : leucine rich repeat), responsable de la reconnaissance des motifs biochimiques particuliers liés aux pathogènes, conservés évolutivement et appelés PAMP (pathogen associated molecular patterns). De plus, il existe une partie transmembranaire riche en cystéines et un domaine intracellulaire identique à celui du récepteur de l'IL1 (Toll/IL1R domain = TIR domain) qui permet l'initiation des voies de signalisation intracellulaires (Prince et al., 2011). L'idée de l'existence des récepteurs immuns capables de reconnaître des particules microbiennes et d'activer la réponse immunitaire avait été postulée par Charles Janeway en 1989 mais la preuve que l'activation de ces récepteurs amène à la traduction de gènes importants dans la défense des organismes a été démontrée par le laboratoire du Pr Jules Hoffmann (Lemaitre, 2004; Lemaitre et al., 2012). Ces auteurs ont habilement combiné des approches génétiques, biochimiques et moléculaires pour démontrer que la voie de signalisation Toll chez les embryons de drosophile est à l'origine de la régulation de motifs dorso-ventraux en activant une protéine Rel (protéine type NFkB).

Les PN humains expriment tous les TLR sauf le TLR3 (Brandes et al., 2013) et le TLR7 (Dang et al., 2011); les plus exprimés sont ceux qui reconnaissent le LPS (TLR4), les lipopeptides bactériens (TLR2), la flagelline (TLR5) ou l'ADN (TLR9). Les PN peuvent aussi détecter des molécules endogènes appelées DAMP (motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires) *via* les TLR, elles sont libérées par des tissus ou des cellules immunitaires en réponse à une blessure ou une infection et sont impliquées dans des processus inflammatoires aigus et chroniques (Prince et al., 2011) D'autre part, les PN expriment aussi les CLR, famille de protéines qui possèdent des lectines membranaires caractérisées par un domaine de reconnaissance des carbohydrates et essentiels dans la réponse antifongique (Thomas and Schroder, 2013). Les PN expriment aussi des PRR cytoplasmiques; les NLR, comme NOD2 et NLRP3 pour réguler l'IL1 $\beta$  *via* l'inflammasome (Ekman and Cardell, 2010). D'autres PRR ont également été décrits plus récemment : les FPR, les RLH, l'HIN-200 et les TREM (Thomas and Schroder, 2013). La liste des PRR décrits dans les PN humains et leurs agonistes est présentée dans le Tableau 1.

Lorsque les PN reconnaissent leur cible, ils vont mettre en place différents mécanismes de destruction microbienne de façon coordonnée.

Tableau 1. PRR exprimés par les PN, d'après Thomas et al., Trends Immunol 2013

PPR	Agoniste
<b>Toll like receptor</b>	
TLR-1	Triacyl lipopeptides (bactéries, mycobactéries)
TLR-2	Lipoprotéines/lipopeptides
TLR-4	Lipopolysaccharides (bactéries à Gram négatif)
TLR-5	Flagellines (bactéries)
TLR-6	Diacyl lipopeptides (mycoplasmes)
TLR-8	ARN simple brin (virus)
TLR-9	ADN hypométhylé, CpG (bactérie)
<b>Récepteurs de lectine de type C</b>	
Dectin-1	$\beta$ -Glucanes (champignons)
Dectin-2	$\alpha$ -Mannose (champignons)
Mincle	$\alpha$ -Mannose (champignons)
CLEC2	Podoplanine (protéine stromale)
CLEC5A	Virus de la dengue
CLEC12A	Pas connu
DCIR	HIV?
DEC205	Activateur du plasminogène (enterobactérie)
CLECSF8	Pas connu
<b>NOD like receptors</b>	
NLRP1/NO	Muramyl dipeptide, sous-unité du PGN
NLRP3	DAMP endogènes et exogènes
NLRP6	Pas connu
NLRC4	Flagellines <i>via</i> les protéines NAIP protéines
<b>Autres PRR</b>	
RIG-I	5' triphosphate RNA court (virus et bactéries intracellulaire)
MDA5	dsRNA longue (virus et bactéries intracellulaire)
IFI16	dsDNA (virus)
LRRFIP1	dsDNA et dsRNA (virus et bactéries intracellulaire)
DDX41	DNA, di-GMP cyclique et di-AMP cyclique (bactéries)
TREM-1	Pas connu
FPR1	Formyl peptides (bactérie et mitochondrie)

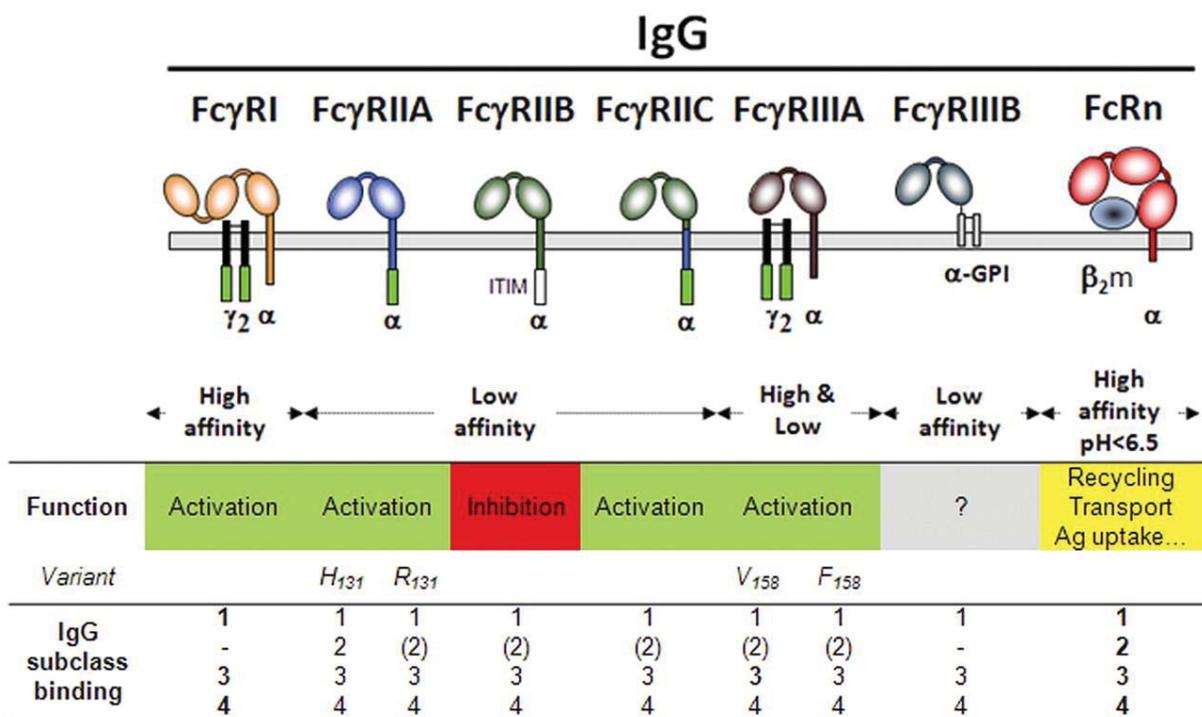
### **1.3.1. Phagocytose**

Dans les années 1880, Elie Metchnikoff désigna la phagocytose comme un mécanisme de défense des organismes pluricellulaires. Elle consiste en la reconnaissance et l'ingestion d'un micro-organisme ou d'une particule (débris cellulaires, cellules apoptotiques, etc...) afin d'en débarrasser les tissus ou éviter une multiplication. Ce processus prépare la dégradation intracellulaire des éléments internalisés (Flannagan et al., 2012).

Les PN sont capables d'une certaine spécificité dans la sélection des particules à phagocyter afin d'éviter la dégradation de cellules saines. Les interactions entre les PN et les cibles peuvent être directes, par la reconnaissance de PAMP par les PRR (décrits ci-dessus), ou bien par opsonisation. Ce dernier phénomène est mis en place grâce à des récepteurs pour le fragment Fc des IgG (FcγR) et par les récepteurs du complément (CR) présents à la surface des PN (Nordenfelt and Tapper, 2011).

Les FcγR sont une classe complexe de récepteurs qui varient selon leur ligand, leur expression et leur fonction (Bruhns, 2012) (Figure 4). Six types de FcγR ont été décrits chez l'homme: FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA et FcγRIIIB. Ils sont exprimés sur tous les phagocytes professionnels et peuvent interagir avec des cibles recouvertes d'IgG et entraîner la formation de pseudopodes. Dans les PN, le FcγRIIA (CD32) et le FcγRIIIB (CD16) sont exprimés constitutivement, alors que l'expression de FcγRI (CD64) est induite par l'INFγ (Rivas-Fuentes et al., 2010). Le FcγRIIA est très important pour la phagocytose car il possède une queue intra-cytoplasmique (la chaîne γ) avec des motifs activateurs ITAM. L'engagement de FcγRIIA induit la phosphorylation de résidus tyrosines de l'ITAM par une Src-kinase qui va initier une cascade de signalisations conduisant à des événements tels que l'élévation du calcium intracytoplasmique, l'activation de Nox2, la polymérisation de l'actine et la dégranulation (Garcia-Garcia et al., 2009). Cependant, le FcγRIIIB - ancré à la membrane par une GPI - induit une activité phagocytaire moins forte que le FcγRIIA. C'est un récepteur efficace pour l'activation de signaux nucléaires activant une voie de signalisation unique qui conduit à la phosphorylation nucléaire de ERK et Elk-1 ; son déclenchement conduit au transit de calcium, à la polymérisation de l'actine, et à la dégranulation sans activation de la Nox2 (Garcia-Garcia et al., 2009). Le FcγRI n'a pas la capacité d'induire la phagocytose ni d'activer ERK dans le noyau des PN, mais il peut améliorer la phagocytose des molécules complexes en coopérant avec les autres récepteurs

(Rivas-Fuentes et al., 2010). L'utilisation d'anticorps bloquants et certains modèles d'animaux KO pour ces récepteurs ont permis, ces dernières années, de révéler leurs rôles, non seulement dans l'activation cellulaire physiologique, mais aussi au cours des maladies inflammatoires (Bruhns, 2012). Par exemple, l'activation des PN *via* le FcγRIIA et le FcγRIIIB est impliquée dans les vascularites à ANCA (Monteiro, 2013). Les PN jouent aussi un rôle dans l'anaphylaxie reconnaissant des complexes immunes *via* le FcγRIV chez la souris (Jonsson et al., 2011) et *via* FcγRIIA chez l'homme (Jonsson et al., 2012). L'importance de l'activation des FcγR dans l'amélioration de l'efficacité des anticorps monoclonaux dans l'immunothérapie des cancers a été récemment évoquée (Albanesi et al., 2012).



**Figure 4. Récepteurs humains des IgG.** Représentation schématique des récepteurs à la membrane cellulaire (barre grise) et leur association ou non à la chaîne dimère de FcRγ (noir). Les boîtes vertes représentent les ITAM, et la boîte blanche, les ITIM. La liaison à une sous-classe d'IgG humaine est indiquée en gras (haute affinité), en plein (faible affinité), ou entre parenthèses (très faible affinité). Le tiret (-) indique aucune liaison. D'après Brunhs P. Bood 2012

La phagocytose médiée par le complément est accomplie par la reconnaissance spécifique de la cible recouverte de C3bi par les récepteurs du complément : CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18, Mac1 ou integrin-αMβ2) et CR4 (CD11c/CD18 ou integrin-αXβ2), présents sur les PN (Tohyama and Yamamura, 2006). Cette phagocytose est peu active ; la particule entre dans la cellule grâce à l'élaboration d'un petit pseudopode

sous la dépendance de microtubules intacts (Underhill and Ozinsky, 2002). Contrairement aux FcγR, les récepteurs du complément ont besoin de *stimuli* additionnels pour permettre la phagocytose, comme le PMA, le TNFα, le LPS ou une liaison avec la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine). Le mécanisme moléculaire aboutissant à cette phagocytose est dépendant de l'activation des voies de signalisation incluant la tyrosine kinase Syk associée constitutivement à la queue intracytoplasmique de CD18 (Tohyama and Yamamura, 2006).

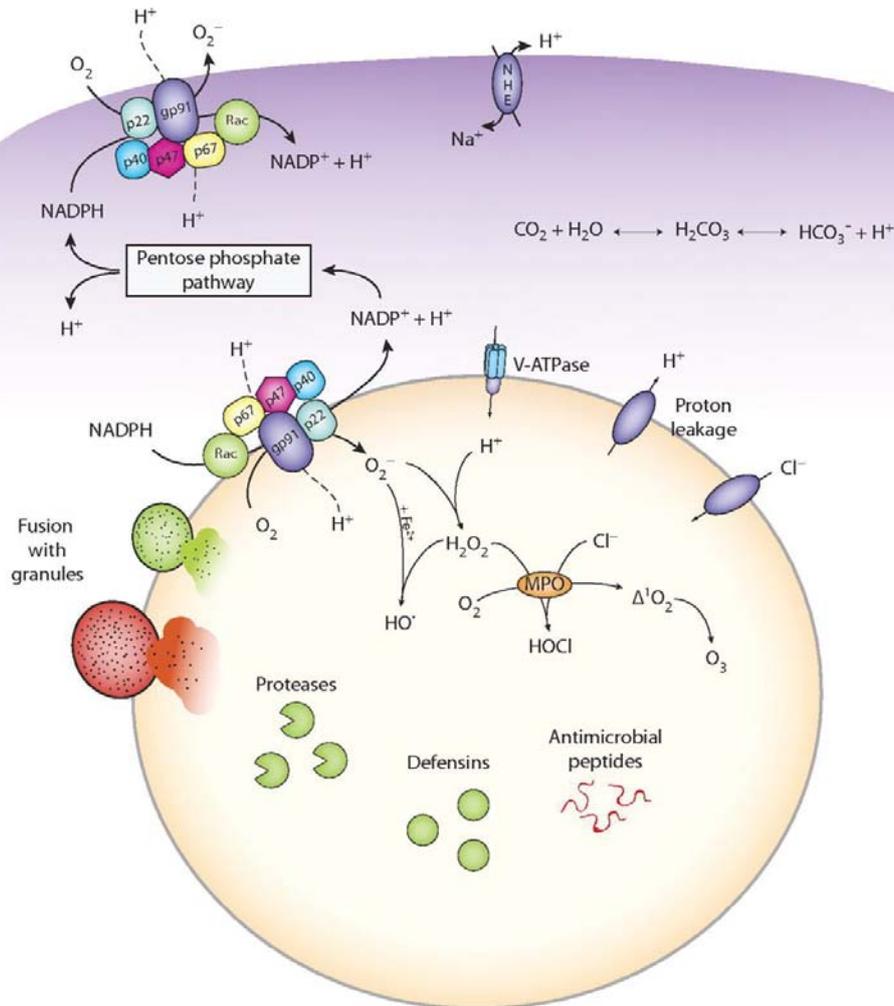
Lorsque la cible est fixée par l'un de ces récepteurs, les PN procèdent à l'invagination de leur membrane plasmique grâce au réarrangement du cytosquelette pour former le phagosome. Bien que les mécanismes permettant l'internalisation soient communs à tous les phagocytes, il existe quelques particularités du PN résumées dans le tableau 2.

Tableau 2. Comparaison de la phagocytose dans les PN et les macrophages

Caractéristique	Polynucléaires Neutrophiles	Macrophages
<b>Interaction avec le microorganisme</b>	PRR-PAMP; FcγR et récepteurs du complément	
<b>Vitesse d'internalisation</b>	Secondes	Minutes
<b>Voie de maturation</b>	Fusion des granulations	Endosomale
<b>Activation de la NADPH-oxydase</b>	Forte production de FRO, intra et extracellulaire	Faible production de FRO, extracellulaire
<b>pH phagolysosomal</b>	pH 7	pH 4-5
<b>Assemblage de l'actine</b>	Polymérisation : Ca-indépendante Dépolymérisation : Ca-dépendante	Calcium-indépendante
<b>Fusion du phagosome</b>	La fusion précoce est Ca-dépendante, et la fusion tardive est Ca-indépendante	La fusion des lysosomes est Ca-indépendante

La maturation du phagosome passe par la fusion des granulations permettant la libération de molécules antimicrobiennes dans la lumière du phagosome. Simultanément, l'assemblage des composants de la NADPH-oxydase se fait sur la membrane interne du phagosome permettant la production des formes réactives de l'oxygène (FRO). Ces deux mécanismes conjoints assurent un environnement toxique

pour la plupart des agents pathogènes. Une autre caractéristique du PN est la régulation du pH à l'intérieur du phagosome. Le maintien d'un pH alcalin est essentiel pour l'activation des sérines protéases (l'élastase et la cathepsine G) ; il est stabilisé par l'intermédiaire de l'activité de la NADPH-oxydase, en dépit de la fusion continue des granulations acides (Nordenfelt and Tapper, 2011). (Figure 5)



**Figure 5. Phagosome des PN.** De nombreux facteurs contribuent à créer dans le phagosome des PN un environnement hostile pour les micro-organismes. Le NADPH, généré par la voie des pentose-phosphates, est le substrat premier de cette réaction pour la génération de FRO. Les FRO avec la fuite de protons, par les pompes à protons (V-ATPase) et avec les échangeurs d'ions (comme l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>) jouent un rôle sur le maintien d'un pH phagosomal neutre. L'activation de la NADPH-oxydase permet la génération de molécules réactives antimicrobiennes. De nombreuses protéases, défensines et peptides antimicrobiens sont également déversés dans le phagosome à partir des granulations. D'après Nordenfelt and Tapper, *Leukoc Biol* 2011.

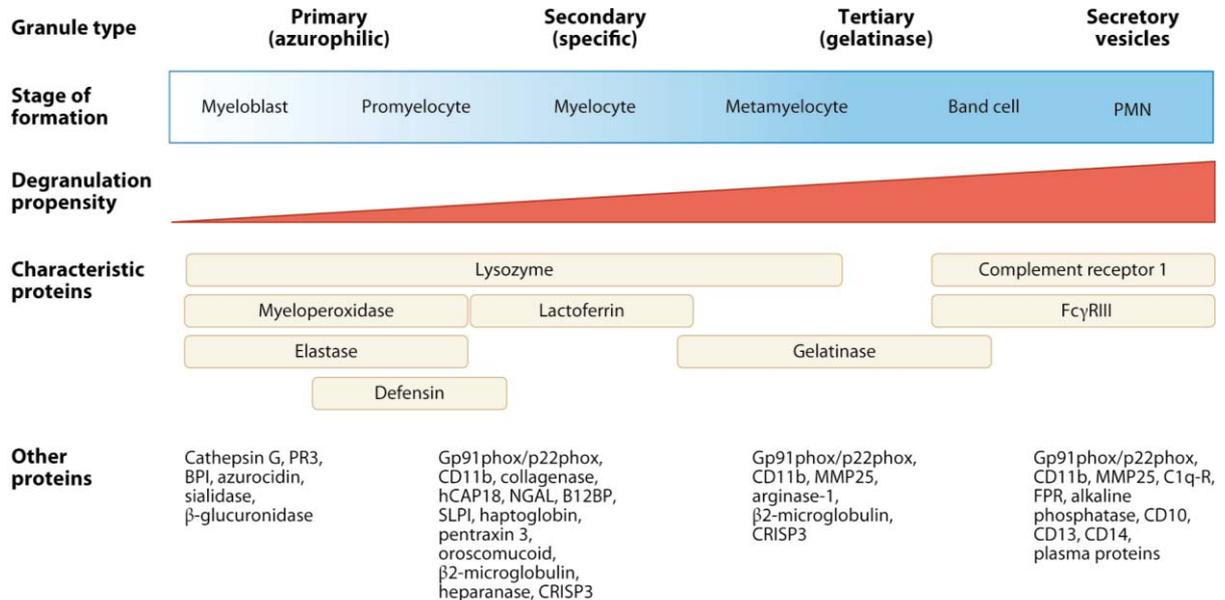
### 1.3.2. Dégranulation

Faisant partie de la famille des granulocytes, le PN contient plusieurs types de granulations produites au cours des différents stades de sa maturation. Cette formation séquentielle des granulations tout au long de la granulopoïèse a donné naissance à l'hypothèse du «targeting-by-timing» illustré dans la Figure 6. Selon ce concept, le contenu protéique d'un type de granulation dépend du stade de maturation au cours duquel ces granulations ont été formées. Les granulations formées durant les derniers stades de la différenciation terminale sont plus sujettes à la mobilisation que celles formées au cours des premiers stades. Classiquement, les granulations sont divisées en quatre catégories : les granulations azurophiles ou primaires, les granulations spécifiques ou secondaires, les granulations à gélatinasses ou tertiaires et les vésicules sécrétoires (Faurischou and Borregaard, 2003). Récemment, Rovig et *al.*, ont repris cette classification ; une étude protéomique a permis une description qualitative et quantitative de la composition de chaque granulation (Rorvig et al., 2013). Les granulations seraient considérées comme un *continuum* contenant des quantités variables de nombreuses protéines plutôt que des sous-ensembles distincts.

Les **granulations azurophiles** ou primaires (GA), sont les plus grandes (environ 0,3  $\mu\text{m}$  de diamètre). Appelées initialement «peroxydase-positive granules» en raison de leur contenu en MPO, elles ont été renommées azurophiles à cause de leur forte affinité pour le colorant basique azur A. Elles sont divisées en deux sous-populations : les granulations pauvres en défensines, apparaissant au début du stade promyélocytaire, et les granulations riches en défensines formées lors de la transition promyélocyte/myélocyte. Elles contiennent aussi le lysozyme, la BPI (Bactericidal/permeability-increasing protein), et un certain nombre de sérine protéases, comme l'élastase (ELA), la protéinase 3 (PR3) et la cathepsine G (CATG). Elles ont une exocytose limitée, mais grâce à leur capacité de fusion avec le phagosome et leur contenu riche en molécules antimicrobiennes, elles participent à la dégradation de nombreux micro-organismes.

Les **granulations spécifiques** ou secondaires (GS), sont plus petites (0.1 $\mu\text{m}$  de diamètre). Elles apparaissent au stade myélocytaire et leur production se poursuit jusqu'au métamyélocyte. Les granulations synthétisées à partir du stade myélocyte ont comme caractéristique commune une absence de MPO. Elles contiennent une

concentration élevée de lactoferrine (LF), glycoprotéine inhibant la prolifération bactérienne. On y trouve aussi des collagénases qui favorisent la migration des PN vers les tissus par digestion du collagène, ainsi que certaines protéines de la membrane plasmique du PN comme le flavocytochrome b558, un des composants de la Nox2.



**Figure 6. Granulations des PN.** Elles contiennent une grande variété d'agents antimicrobiens et des molécules fonctionnelles. Elles sont divisées en trois types : primaires ou azurophiles, secondaires ou spécifiques, tertiaires ou à gélatinases. En outre, les structures appelées vésicules sécrétoires sont aussi un sous-groupe de granulations. Leur contenu semble être déterminé par le moment de la granulopoïèse pendant lequel ces granulations sont constituées. Elles diffèrent aussi par leur capacité à se mobiliser, les vésicules sécrétoires sont les premières à fusionner avec la membrane plasmique tandis que les granulations azurophiles sont moins efficaces. D'après Amulic et al, Annu Rev Immunol 2012.

Les **granulations à gélatinasse** ou tertiaires (GC), qui apparaissent tardivement dans la maturation du PN, sont dépourvues de MPO et de LF mais sont très riches en gélatinasses, qui, comme la collagénase, mènent à la digestion de la matrice extracellulaire et favorisent la migration du PN en situation inflammatoire.

Les **vésicules sécrétoires** (VS), sont aussi considérées comme faisant partie de la famille des granulations des PN. Elles sont formées par endocytose dans les derniers stades de maturation des PN et leur contenu se compose principalement de protéines plasmatiques comme l'albumine. La membrane des vésicules sécrétoires sert de réservoir pour un certain nombre de molécules membranaires utilisées lors de la migration des PN.

En 2009, les **granulations de ficollines** (FG) ont été décrites, pour leur contenu riches en Ficolline-1 (Rorvig et al., 2009). Ces granulations ont un contenu proche de celui des VS (HSA, CR1 et gélatinasse).

Au cours de l'activation des PN, les granulations sont mobilisées et vont fusionner avec la membrane plasmique ou avec le phagosome, libérant ainsi leur contenu dans le milieu environnant. Dans les deux cas, la membrane de la granulation devient une partie permanente de la membrane cible, modifiant ainsi sa composition moléculaire. Ce processus permet l'expression forte d'un grand nombre de molécules d'adhérence, comme la  $\beta 2$ -intégrine, indispensables à la migration au site inflammatoire et à la reconnaissance de la cible du PN. L'association entre les SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor) et les VAMP (vesicle-associated membrane proteins) va permettre de réguler la mobilisation des granulations à l'intérieur de la cellule (Mollinedo et al., 2006) ; des modifications dans ces protéines vont non seulement jouer un rôle dans l'exocytose des granulations mais aussi dans l'explosion oxydative (Uriarte et al., 2011) et l'ontogénie des PN (Stepensky et al., 2013). L'exocytose du contenu des granulations s'effectue de façon séquentielle, les granulations de ficollines seront les premières à être libérées, puis les vésicules sécrétoires sont les plus facilement mobilisables, suivies des granulations à gélatinasses, des granulations spécifiques et finalement des granulations azurophiles (Amulic et al., 2012; Rorvig et al., 2013). Le niveau de  $Ca^{2+}$  intracellulaire joue un rôle-clé dans le processus, l'exocytose des granulations azurophiles ne s'effectuant qu'à des concentrations calciques retrouvées tardivement dans le processus d'activation du PN (Nordenfelt and Tapper, 2010).

Le cytosquelette d'actine joue aussi un rôle primordial dans le processus d'exocytose des granulations. D'une part, sa polymérisation agit comme une barrière à l'exocytose, d'autre part, l'exocytose des granulations primaires requiert l'utilisation d'agents dépolymérisants de l'actine tels que la cytochalasine B. Il semblerait donc que la polymérisation de l'actine soit nécessaire pour diriger les granulations vers la membrane plasmique mais qu'une dépolymérisation concomitante soit requise au niveau du pôle cellulaire d'exocytose; il existe donc des successions de polymérisation et dépolymérisation du cytosquelette d'actine pour permettre la dégranulation. (Jog et al., 2007)

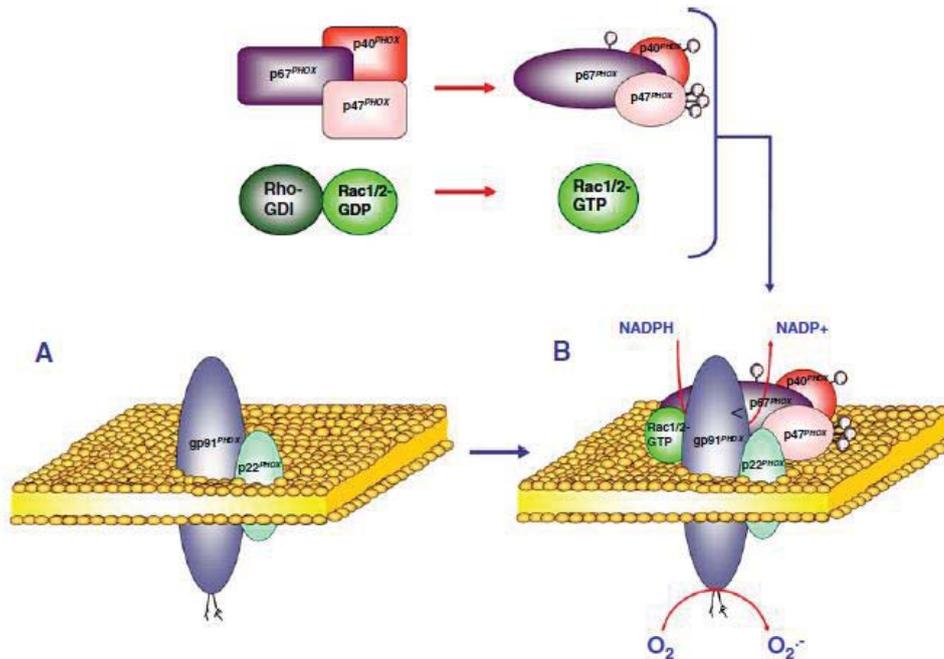
Ainsi, la libération de molécules microbicides par dégranulation est nécessaire à la réponse immunitaire pour contrôler les pathogènes. Plusieurs de ces protéines granulaires sont appelées « alarmines » car elles participent au recrutement et à l'activation d'autres cellules du système immunitaire et sont impliquées dans la modulation de la réponse adaptative (Yang and Oppenheim, 2009; Yang et al., 2013).

### 1.3.3. Explosion oxydative

La production de FRO *via* l'explosion oxydative est un outil clé dans la destruction des microbes. Cette activité microbicide se fait essentiellement par une voie dépendante de la NADPH-oxydase. Celle-ci est induite précocement, dès l'activation du PN, par l'assemblage de différentes composantes au niveau de la membrane plasmique de la cellule ou des membranes du phagosome. La NADPH-oxydase appartient à la famille des Nox. Actuellement, sept enzymes homologues ont été décrites dans plusieurs types cellulaires et répertoriées en deux familles (Brandes et al., 2013). Les protéines de la famille Nox (Nox 1, 2, 3, 4 et 5) possèdent six hélices transmembranaires avec quatre résidus histidines, en association avec deux hèmes et une région C-terminale cytosolique, contenant les sites de fixation hautement conservés du FAD et du NADPH. Les membres de la famille Duox (Duox 1 et 2) possèdent aussi une extension N-terminale, formée de deux motifs EF-hand suivis d'une hélice transmembranaire et d'un domaine peroxydase-homologue sur la face externe de la membrane plasmique, leur permettant de transformer l'anion superoxyde en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La Nox2 est la première enzyme de la famille des Nox à avoir été identifiée, elle est exprimée à la surface des PN. La Nox2 est un complexe enzymatique formé de plusieurs protéines : p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> et gp91<sup>phox</sup>. Ces protéines sont spécifiques de Nox2, alors que Rac1/2, une GTPase nécessaire au fonctionnement de Nox2, est aussi utilisée par d'autres voies de signalisation (Makni-Maalej et al., 2013). Dans les PN au repos, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> et Rac1/2 sont dans le cytosol, alors que gp91<sup>phox</sup> et p22<sup>phox</sup> forment un dimère membranaire appelé flavocytochrome b558 (El-Benna et al., 2008) (Figure 7). Lors de l'activation du PN, p47<sup>phox</sup>, dont l'activité est inhibée dans le PN au repos, est phosphorylée au niveau de plusieurs résidus sérine par différentes kinases telles que la PKC, la p38MAPK, ERK et Akt, ce qui permet un changement de conformation et l'activation de cette sous-unité (El-Benna et al., 2009). Une fois activée, p47<sup>phox</sup> joue le rôle de déclencheur de l'assemblage des autres

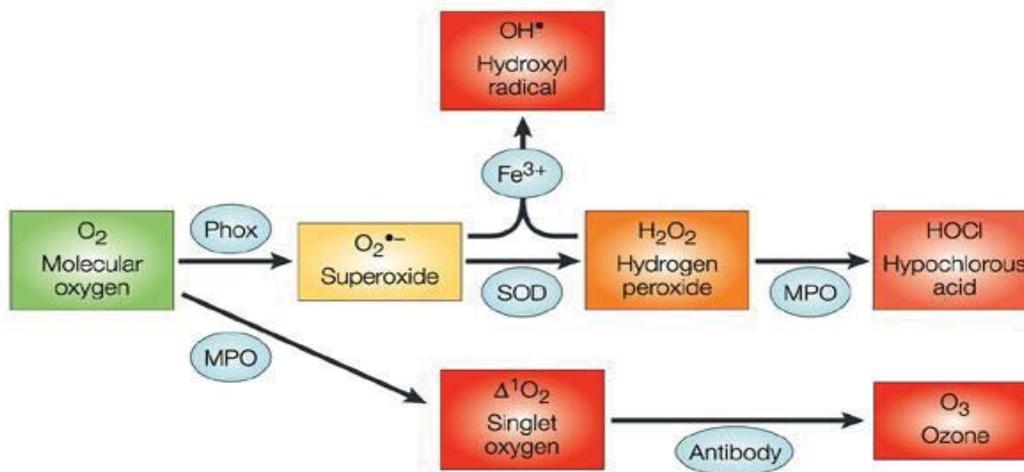
composants de Nox2. A l'opposé, la sous-unité p67<sup>phox</sup> est constamment phosphorylée dans les PN au repos *via* ERK1/2, et cette phosphorylation est augmentée après activation cellulaire (Dang et al., 2011). Ainsi, ces deux sous-unités p67<sup>phox</sup> et p40<sup>phox</sup> vont se lier au niveau du cytosol et le nouveau complexe formé se dirige vers le flavocytochrome b558 membranaire. Simultanément, Rac1/2, qui se trouve aussi au niveau du cytosol, se dirige également vers la membrane.



**Figure 7. Activation de l'explosion oxydative par Nox2.** L'activation de la NOX2 se produit à la suite de l'assemblage des protéines cytosoliques (p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup>) avec celles du flavocytochrome b558 (composé de la sous-unité catalytique associée à la membrane : gp91<sup>phox</sup> et p22<sup>phox</sup>). Cette activation implique des protéines kinases, des enzymes métabolisant les lipides et des protéines d'échange des nucléotides qui activent la RAC GTPase. D'après El benna et al., Semin Immunopathol 2008.

Une fois transloqués à la membrane, p67<sup>phox</sup> interagit avec gp91<sup>phox</sup> et Rac1/2, formant ainsi la composante catalytique de Nox2. Il se forme un canal au niveau de la membrane du phagosome, permettant le transport d'électrons du cytosol vers des molécules d'oxygène situées à l'intérieur du phagosome. L'oxygène sera ainsi transformé en anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), qui seront rapidement convertis en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par la superoxyde dismutase. Les anions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène ainsi que les radicaux hydroxyles (<sup>-</sup>OH) sont des agents oxydants létaux pour la plupart des microbes, même présents en petite quantité (Figure 8). Cette

nécessité d'assembler l'enzyme afin qu'elle soit active permet au PN de contrôler sa production de FRO, évitant ainsi une destruction cellulaire inappropriée dans des conditions non-inflammatoires. (Bedard and Krause, 2007).



**Figure 8. Métabolisme des FRO et réactivités comparées.** Le code couleur indique la réactivité des molécules individuellement. Vert, peu réactif ; jaune, réactivité limitée ; orange, réactivité modérée ; rouge, forte réactivité. D'après Lambeth, Nat Rev Immunol 2004

De son côté la MPO, retrouvée à l'intérieur du phagosome après la dégranulation, catalyse une réaction entre le peroxyde d'hydrogène et l'ion chlore ( $\text{Cl}^-$ ), produisant de l'acide hypochloreux (HOCl) (Morgan et al., 2009) (Figure 8). L'HOCl possède un potentiel bactéricide très important. De plus, la MPO inactive l' $\alpha_1$ -protéinase, un inhibiteur majeur des sérines protéases, contribuant ainsi à la dégradation des protéines bactériennes (Winterbourn et al., 2006)

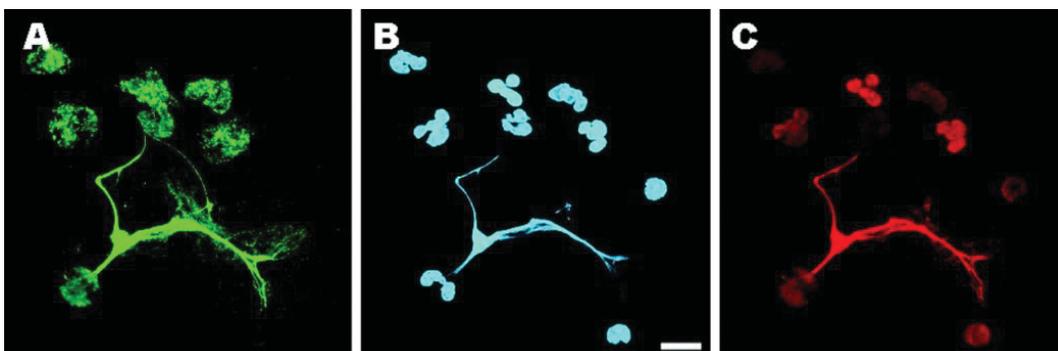
L'importance de l'explosion oxydative, en tant que mécanisme de défense contre les microbes, est attestée par l'existence d'une maladie liée à une anomalie dans un des gènes codant pour les différents composants de la NADPH-oxydase, la granulomatose septique familiale (CGD) (Kannengiesser et al., 2008). Les deux formes les plus fréquentes sont liées à un défaut dans  $\text{gp91}^{\text{phox}}$  (liée à l' $\text{X}$ , environ 70% des cas) ou un défaut dans  $\text{p47}^{\text{phox}}$  (autosome récessif, environ 25% des cas). Cette maladie est caractérisée par une diminution profonde ou totale de la production de FRO et en conséquence, la présence d'infections bactériennes et fongiques récurrentes et sévères. (Desjardins et al., 2012). Dans le cas contraire, la production exacerbée de FRO est liée à des dommages tissulaires au cours des processus inflammatoires où

les PN sont impliqués, comme c'est le cas dans l'ischémie hépatique et du TRALI dans les poumons (Grommes and Soehnlein, 2011; Jaeschke, 2011) . En effet, par exemple, la phosphorylation de certaines sérines de la sous-unité p47<sup>phox</sup> induit l'amorçage des PN en favorisant la production de FRO (Makni-Maalej et al., 2012) ; de ce fait, une altération de ces phosphorylations peut conduire à l'hyper-activation des PN et une augmentation de la libération de FRO toxiques pour le milieu tissulaire environnant (Hurtado-Nedelec et al., 2013).

Paradoxalement, alors que la MPO est nécessaire pour l'activité microbicide des PN *in vitro*, la plupart des patients déficitaires en MPO sont asymptomatiques. Une petite proportion présente des infections sévères essentiellement dues à *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*. Ces déficits sont la plupart du temps partiels, car les patients sont hétérozygotes et des mécanismes compensatoires sont mis en place. (Ren R, 2012)

#### 1.3.4. NETose ou production des Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

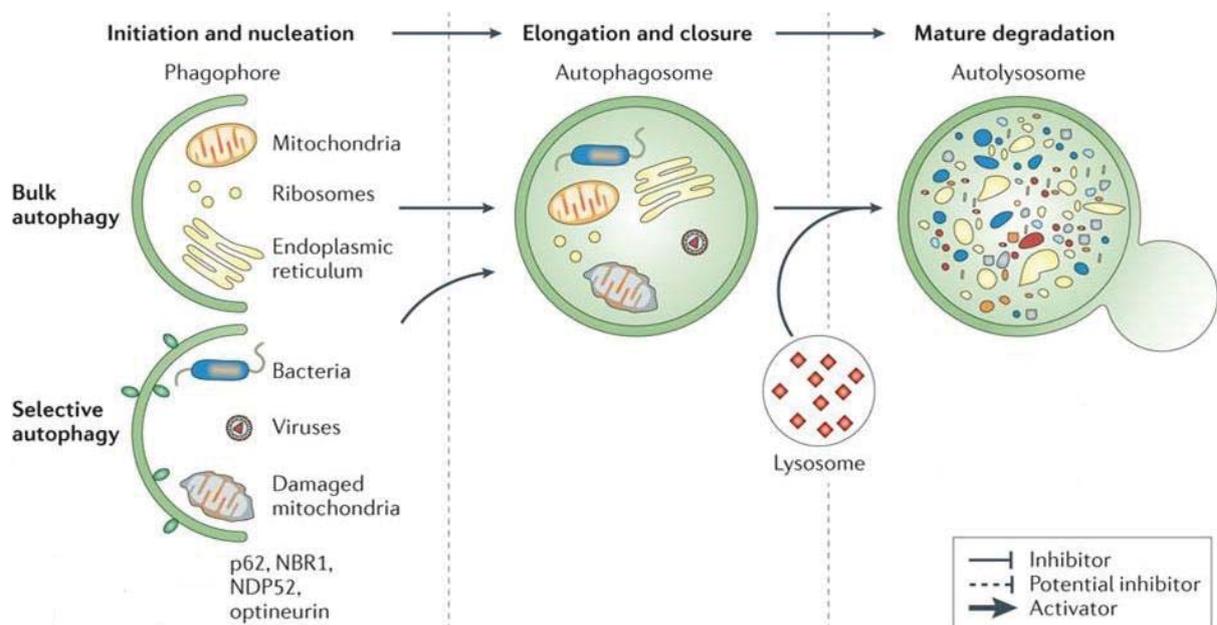
La NETose est un mécanisme d'activation du PN, qui aboutit à la libération dans l'espace extracellulaire, de filaments de chromatine décondensée recouverts de protéines issues des différents compartiments de la cellule, ces filaments sont appelés neutrophil extracellular traps ou NETs (Figure 9). Les NETs piègent de nombreux types de micro-organismes et peuvent les tuer grâce à la forte concentration locale de protéines antimicrobiennes (Brinkmann et al., 2004). La NETose est également impliquée dans la physiopathologie de nombreuses maladies inflammatoires, en dehors des infections. Ce sujet sera développé dans le chapitre suivant.



**Figure 9. Neutrophil Extracellular Traps.** L'activation des PN induit la libération de NETs. Ces structures contiennent de l'ELA (A), de l'ADN (B), et des histones (H2A-H2B) (C). — 200 nm. D'après Brinkmann et al. Sciences 2004 (Description originale des NETs).

### 1.3.5. Autophagie

L'autophagie a été considérée parfois comme un mécanisme alternatif de mort cellulaire programmée, activé lorsque l'apoptose échoue (Yang and Klionsky, 2010) mais actuellement elle est considérée comme un mécanisme majeur dans la régulation des métabolismes tissulaires et cellulaires (Boya et al., 2013). Elle est caractérisée par la formation de vésicules à double membrane appelée autophagosomes, qui séquestrent les structures cytoplasmiques ciblées pour être détruites ou recyclées (Figure 10). L'autophagie est un mécanisme de défense contre les bactéries intracellulaires, en particulier dans les macrophages et aussi dans les PN (Jo et al., 2013; Mihalache and Simon, 2012). Dans un modèle d'infection par *S. Typhimurium*, les PN murins activent l'autophagie par un mécanisme Nox2-dépendant (Huang et al., 2009); un autre travail confirme le rôle de l'explosion oxydative pour induire l'autophagie dans les PN et son implication dans la phagocytose (Mitroulis et al., 2010). De plus, le mécanisme de production des NETs par les PN peut nécessiter l'induction de l'autophagie (Remijsen et al., 2011).



**Figure 10. Voie de l'autophagie.** La formation de l'autophagosome repose sur la nucléation d'une structure de membrane, le phagophore, qui suite à son élongation et la fermeture forme une vacuole à double membrane : l'autophagosome. La maturation se produit lorsque l'autophagosome fusionne avec le compartiment endolysosomal. La dégradation finale des particules se produit dans l'autolysosome. D'après Rubinsztein et al. Nat Rev Drug Discov 2012.

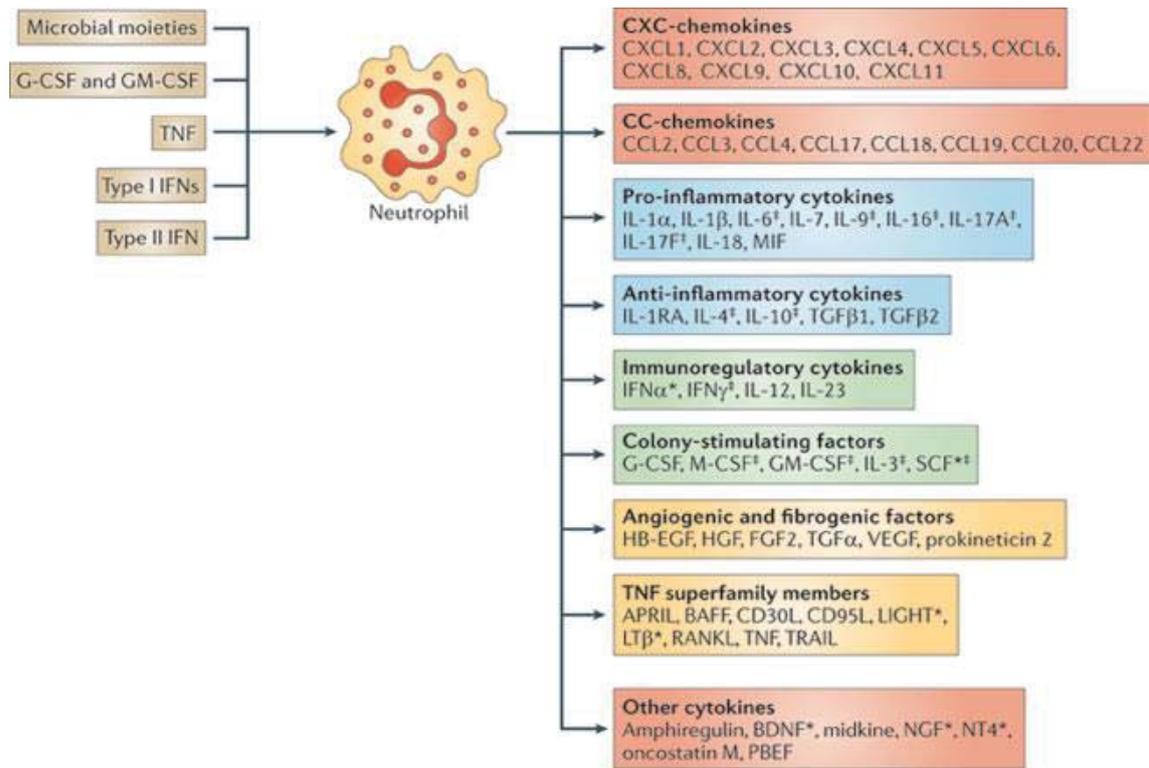
#### 1.4. Médiateurs générés par les PN au cours de l'inflammation

Les PN ont été longtemps considérés comme ayant peu d'activité transcriptionnelle et peu de synthèse protéique. Ces dernières années, différents travaux ont permis de revoir ce dogme. Il est démontré maintenant que les PN synthétisent de nombreux médiateurs nécessaires à la réponse immunitaire innée, mais aussi à leur régulation, la réparation tissulaire et la mise en place coordonnée d'une réponse adaptative optimale. (Jaillon et al., 2013)

##### 1.4.1. Médiateurs peptidiques: les cytokines et les chimiokines

Les cytokines sont des protéines de faible poids moléculaires (entre 8-50kDa) solubles, produites par de nombreux types cellulaires en réponse à des *stimuli* activateurs. Elles agissent essentiellement de manière autocrine et paracrine, bien qu'un certain niveau d'action endocrine ait été démontré. Les cytokines sont pléiotropes, c'est-à-dire qu'une seule cytokine peut agir sur différents types cellulaires. Elles sont aussi très redondantes, plusieurs cytokines pouvant agir de façon similaire sur une même cible. Finalement, les cytokines peuvent agir en synergie pour générer certains effets biologiques. Les chimiokines sont des protéines de 8 à 14 kDa ; elles représentent un sous-groupe particulier de cytokines, ayant comme rôle principal le recrutement leucocytaire au site inflammatoire. Les chimiokines sont divisées en plusieurs groupes selon l'arrangement des résidus cystéine au niveau de leur extrémité N-terminale. Le PN produit des chimiokines des familles C-C et C-X-C. (Lindell D. and N., 2010)

De nombreuses cytokines peuvent être libérées par les PN, soit spontanément soit après stimulation, en particulier les cytokines pro-inflammatoires, anti-inflammatoires, immuno-régulatrices, angiogéniques, fibrogéniques, des facteurs de croissance ou des ligands appartenant à la superfamille du TNF. Pour leur part, les chimiokines sont particulièrement représentées parmi les cytokines produites par les PN, agissant de manière autocrine sur les PN ou bien sur d'autres cellules du système immunitaire. Les PN jouent ainsi un rôle majeur dans l'orchestration du recrutement et de l'activation des leucocytes dans le tissu inflammatoire (Cassatella, 1999; Cassatella, 2013). La Figure 11 résume le répertoire des cytokines que les PN peuvent libérer.



**Figure 11. Profil des cytokines pouvant être libérées par les PN activés.** L'expression et/ou la production de ces cytokines a été validée par des techniques d'expression des gènes, d'immunohistochimie, par ELISA ou par dosages biologiques spécifiques des cytokines, réalisées sur des cellules humaines et / ou murines. \* études réalisées au niveau de l'ARNm. ‡ données controversées dans les PN humains. D'après Mantovanni et al, Nat Rev Immunol 2011.

La production de cytokines par les PN est contrôlée par des mécanismes de régulation qui agissent à différents niveaux, en particulier au niveau de la transcription de l'ARNm, de sa stabilité, de la traduction ou de la sécrétion de la protéine. (Cassatella, 1999; Cassatella, 2013)

Certaines cytokines ont, dans les PN, un mode original de libération. Elles ne sont que peu synthétisées en réponse à un *stimulus* donné, mais elles sont stockées préformées dans des compartiments intracellulaires comme les granulations et sont libérées rapidement en cas de besoin. C'est le cas, par exemple, du facteur activateur des LyB (BAFF ou BLYS) (Scapini et al., 2008), du ligand de TRAIL (Tecchio et al., 2013), de CXCL8 (Tecchio et al., 2013), de CCL20/MIP-3 $\alpha$  (Scapini et al., 2001), de l'HGF (Grenier et al., 2002) ou de l'oncostatine M (OSM) (Grenier et al., 1999).

Dans le microenvironnement inflammatoire, les protéases dérivées des PN peuvent réguler l'activité biologique de certaines cytokines. Par exemple, l'ELA et la

CATG peuvent cliver l'IL-33 dans sa forme mature/bioactive (Lefrançais et al., 2012). Dans un modèle murin de pneumonie induite par *P. aeruginosa*, l'ELA induit la production de TNF $\alpha$ , MIP-2/CXCL2 et IL-6 par les macrophages pulmonaires *via* un mécanisme dépendant de TLR4 (Benabid et al., 2012).

La liste des cytokines produites par les PN s'allonge régulièrement, une des dernières identifiée est l'IL-27 produite au cours du sepsis (Rinchai et al., 2012).

Les PN murins expriment constitutivement le complexe inflammasome NLRP3, qui sera activé en réponse au LPS ; les PN sont ainsi la principale source d'IL-1 $\beta$  en réponse aux activateurs classiques de l'inflammasome (ATP, cristaux de silice,...) (Mankan et al., 2012) ; cependant la sécrétion de cette cytokine est régulée par la production de ROS (Gabelloni et al., 2013a).

La capacité de production de certaines cytokines par les PN reste encore un sujet controversé. Des différences semblent exister entre les PN murins et humains. De plus, le degré de purification variable des cellules peut être à l'origine de résultats discordants publiés dans la littérature. En particulier, l'expression de l'IL-10 est très discutée (Cassatella et al., 2009; Davey et al., 2011; De Santo et al., 2010). Les PN humains ne seraient pas capables de produire cette cytokine en réponse à la plupart des *stimuli* classiques (Reglier et al., 1998). Mais, plus récemment, il a été décrit que dans les PN le locus génomique de l'IL-10 était dans un état inactif, n'induisant pas la transcription de son ARNm (Tamassia et al., 2013). En ce qui concerne les PN murins, plusieurs études ont démontré qu'ils produisaient de l'IL-10, par exemple lors d'une infection disséminée à *Candida* (Greenblatt et al., 2010), à *S. aureus* résistant à la méthicilline (Tsuda et al., 2004), dans une modèle de pneumonie (Zhang et al., 2009) ou durant une infection par *Trypanosoma cruzi* (Tosello Boari et al., 2012).

La production d'INF $\gamma$  et d'IL-17 par les PN est aussi un sujet de discussion (Cassatella, 2013). Certains travaux proposent que les PN humains et murins infiltrant les lésions cutanées psoriasiques et la synovie au cours de la polyarthrite rhumatoïde, expriment de l'IL-17A (Lin et al., 2011; Moran et al., 2011).

Au total, plusieurs éléments originaux sont à noter dans l'analyse de cette propriété. Le premier concerne la nécessité d'une méthode d'isolement des PN optimale afin d'explorer les capacités des PN non contaminés par d'autres cellules (par ex. les monocytes). Il faut noter aussi que la biologie entre les PN humains et murins est

différente. Enfin, le large spectre de cytokines produites par les PN permet d'impliquer ces cellules dans la modulation de la réponse immunitaire ; grâce aux cytokines, les PN communiquent avec les cellules et tissus environnants. Par exemple, Tecchio et al., ont décrit le rôle prépondérant des cytokines du PN dans le développement tumoral, leurs capacités pro- et anti-tumorales, ainsi la possibilité de développer des cibles thérapeutiques potentielles. (Tecchio et al., 2013)

#### 1.4.2. Médiateurs lipidiques : les prostaglandines et les leucotriènes

Les prostaglandines (PG) sont des métabolites de la cyclooxygénase (COX) synthétisés à partir de l'acide arachidonique (AA), un acide gras insaturé de 20 carbones lié aux phospholipides membranaires (Serhan C. and J., 2010). Ils peuvent présenter des effets pro- et anti-inflammatoires, leur conférant ainsi un rôle dans la modulation du processus inflammatoire. Les PN synthétisent essentiellement de la PGE<sub>2</sub> (prostaglandine E<sub>2</sub>) et du TXA<sub>2</sub> (tromboxane A<sub>2</sub>) ; ce dernier est aussi produit par les plaquettes, les éosinophiles, les basophiles, les macrophages et les cellules endothéliales, favorisant ainsi l'agrégation plaquettaire en plus de l'effet vasoconstricteur. (Ranganathan et al., 2013; Yang and Unanue, 2013)

Exprimée dans les PN, la COX, aussi appelée PGH synthétase, existe sous deux isoformes, COX-1 et COX-2. Alors que la COX-1 est présente de manière constitutive et joue essentiellement un rôle dans l'homéostasie cellulaire, la COX-2 est peu exprimée dans les cellules au repos, mais son expression est induite par de nombreux *stimuli* comme les facteurs de croissance, certaines hormones, des oncogènes et plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$ . La COX-2 serait impliquée dans la pathogenèse de plusieurs maladies inflammatoires et certains cancers. (Bachawaty et al., 2010; Wang and Dubois, 2010)

Les leucotriènes (LT) sont des médiateurs lipidiques dérivés de l'AA et synthétisés à partir de la voie de la 5-lipoxygénase (5-LO). La famille des LT est divisée en deux groupes, les cysteinyl LT (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> et LTE<sub>4</sub>) et le LTB<sub>4</sub>. Alors que les cysteinyl LT sont impliqués dans la réaction anaphylactique, dans l'œdème et l'asthme, le LTB<sub>4</sub> est, de son côté, un puissant chimioattractant des PN (Batra et al., 2012; Lammermann et al., 2013; Oyoshi et al., 2012). Le PN est aussi un important producteur de LTB<sub>4</sub>, confirmant cette propriété originale des PN, à la fois cibles et producteurs de nombreux médiateurs de l'inflammation (Afonso et al., 2012).

En plus de son rôle dans le recrutement et l'activation du PN, le LTB<sub>4</sub> favorise les interactions entre les PN et les cellules endothéliales, diminue l'apoptose, diminue le seuil de la douleur, est impliqué dans la bronchoconstriction et favorise l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Les PN possèdent aussi deux récepteurs de surface liant le LTB<sub>4</sub> : BLT1 et BLT2 qui permettent la signalisation intracellulaire par le biais de la protéine Gαi/0. (Nam et al., 2012; Tager and Luster, 2003)

Les PN sont aussi de grands producteurs du facteur d'activation plaquettaire (PAF). Le PAF est un puissant médiateur phospholipidique, il est capable non seulement d'activer les plaquettes mais il induit également la constriction des voies respiratoires supérieures, l'hypotension et la perméabilisation vasculaire. L'activation des PN avec des complexes immunes provoque la production de PAF, qui est ainsi un acteur important au cours du choc anaphylactique médié par les PN chez l'homme (Jonsson et al., 2011) et chez la souris (Tanaka et al., 2012).

### **1.5. Rôles des PN dans la résolution de l'inflammation**

La résolution de l'inflammation est un processus actif qui limite l'infiltration leucocytaire et élimine les cellules apoptotiques des sites inflammatoires. Ce processus est essentiel pour le maintien de l'homéostasie tissulaire et son altération est associée à de nombreux états pathologiques. Les PN ont longtemps été considérés, à tort, comme des cellules effectrices de la réponse inflammatoire sans rôle actif au cours de la résolution.

La résolution de l'inflammation est un processus complexe qui sera divisé ci-dessous en trois phases : la phase de pro-résolution, la phase anti-inflammatoire et la phase de reconstitution tissulaire.

#### **1.5.1. Phase de pro-résolution : l'apoptose**

Au cours de l'apoptose, les PN présentent les caractéristiques morphologiques typiques associées à ce type de mort cellulaire, telles qu'un aspect arrondi de la cellule, la réduction du volume cellulaire et la fragmentation nucléaire. Les PN peuvent s'engager vers la voie de mort intrinsèque ou extrinsèque, aboutissant à l'activation des caspases. La perte de leur potentiel transmembranaire mitochondrial, pendant l'apoptose, va non seulement promouvoir l'activation des caspases mais aussi libérer des protéines pro-apoptotiques. Ainsi, l'apoptose des PN serait gouvernée par les

intensités d'expression cellulaire de molécules pro- et anti-apoptotiques ; les PN expriment de façon constitutive les protéines pro-apoptotiques **Bax**, **Bid**, **Bim**, **Bak** et **Bad**, et de façon inductible, les molécules anti-apoptotiques **A1** et **Mcl-1**, l'expression de **Bcl-XL** étant encore discutée (Gabelloni et al., 2013b). De plus, la phosphatidylsérine, caractéristique des cellules apoptotiques, apparaît sur le feuillet externe de la membrane plasmique, par perte de l'asymétrie membranaire normale. L'externalisation de cette molécule facilite la reconnaissance des PN apoptotiques par les macrophages. La reconnaissance et l'ingestion des PN apoptotiques par les macrophages induisent un phénotype M2-like de ces macrophages (IL-10<sup>high</sup> IL-12<sup>low</sup>) qui régule négativement l'inflammation et stimule la réparation des tissus. (Ariel and Serhan, 2012)

Dans divers modèles inflammatoires, l'apoptose des PN constitue un point de contrôle critique dans la résolution de l'inflammation, contrôlant l'étendue des dommages tissulaires ainsi que la durée et l'intensité des réponses inflammatoires. La biosynthèse de médiateurs pro-résolution est augmentée dans les PN au cours de l'apoptose et dans les macrophages après la phagocytose de cellules apoptotiques. En effet, les médiateurs lipidiques anti-inflammatoires et pro-résolution dérivés des acides gras essentiels, tels que la lipoxine A4 (**LXA4**) et la resolvin E1 (**RvE1**), les autacoïdes et les protéines, comme l'Anexine A1 (AnxA1) et le TRAIL, et les inhibiteurs de CDK (kinases cycline-dépendantes), améliorent la phagocytose et l'élimination des cellules apoptotiques, mettant ainsi en place une boucle d'amplification. (El-Kebir and Filep, 2013) (Figure 12)

La commutation des PN vers un phénotype anti-inflammatoire se manifeste par un changement du profil de médiateurs lipidiques. Les cellules du tissu inflammatoire, en particulier les PN, produisent des médiateurs lipidiques pro-résolution comme la **LXA4** (Serhan et al., 2008). La LXA4 va atténuer l'activation cellulaire médiée par la MPO et faciliter la dégradation de Mcl-1, ce qui conduit à réduire le potentiel transmembranaire mitochondrial et la mort induite par la caspase-3 (El Kebir et al., 2009; Jozsef et al., 2002). Elle va aussi initier le recrutement de monocytes et favoriser la phagocytose des PN apoptotiques par les macrophages (Serhan et al., 2008). La **RvE1** raccourcit la durée de vie des PN en présence d'agents pathogènes opsonisés par l'augmentation de la production de FRO *via* la NADPH-oxydase et l'activation de la caspase-8 et de la caspase-3 (El Kebir et al., 2012). Sa liaison au BLT1 (récepteur du LTB<sub>4</sub>) facilite

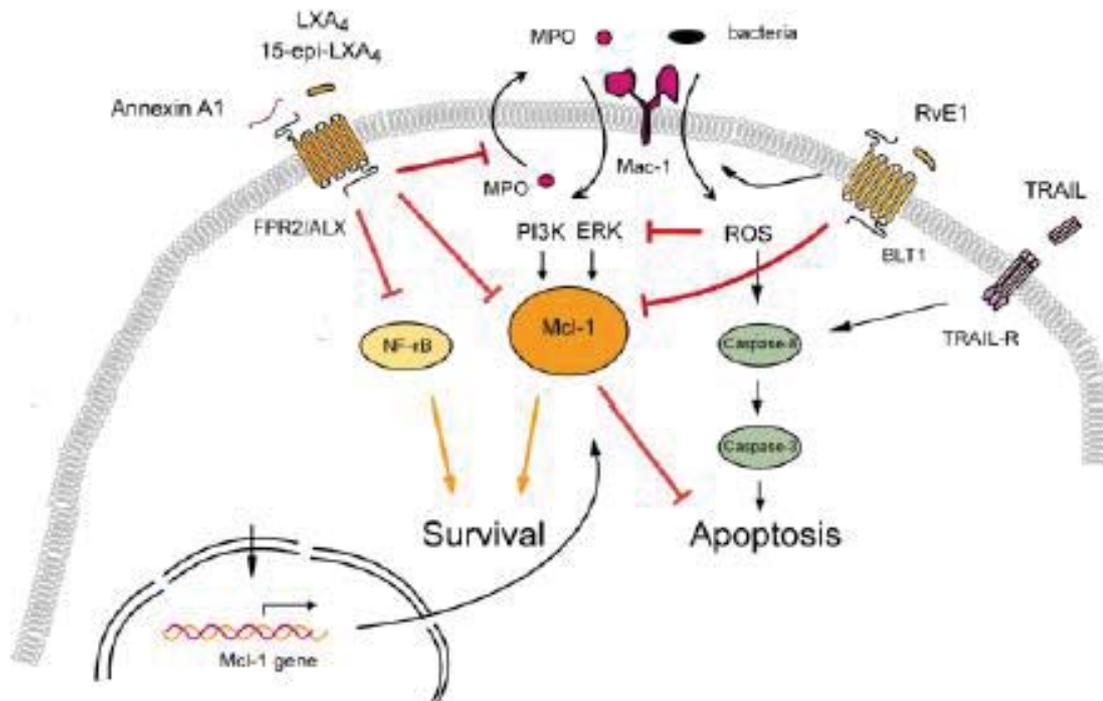
l'apoptose par diminution de la survie médiée par la MPO, aboutissant à une réduction des niveaux de Mcl-1 (El Kebir et al., 2012). Elle stimule aussi la phagocytose des PN apoptotiques par les macrophages en se liant au ChemR23 (Serhan et al., 2008). De plus, les médiateurs pro-résolution LXA4, RvE1 et PD1 augmentent l'expression de CCR5 sur les PN apoptotiques qui vont ainsi aider à l'élimination de CCL3 et CCL5 des sites inflammatoires (Ariel et al., 2006).

Par ailleurs, la protéine **AnxA1** est un médiateur anti-inflammatoire induit par les glucocorticoïdes ; dans les PN, elle est rapidement mobilisée du cytoplasme vers la surface de la cellule après adhésion à l'endothélium (Perretti and D'Acquisto, 2009). L'AnxA1 induit l'apoptose des PN par activation de la caspase-3 et inhibition de Mcl-1, ERK 1/2 et des signaux de survie médiés par NFκB (Vago et al., 2012). L'AnxA1 pourrait favoriser l'efferocytose des PN par les macrophages *in vitro*, dans la moelle osseuse et dans les poumons inflammatoires (Dalli et al., 2012; Vago et al., 2012). Cette protéine serait donc cruciale pour la résolution de l'inflammation spontanée ou induite par les glucocorticoïdes.

L'induction de l'apoptose pour réguler le nombre de PN pendant un processus inflammatoire implique aussi la protéine **TRAIL** (McGrath et al., 2011); les PN expriment à leur surface les récepteurs TRAIL-R1 et -R2 et peuvent aussi produire la protéine TRAIL (Cassatella et al., 2006; McGrath et al., 2011).

Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs des **CDK** et de **PCNA** (proliferating cell nuclear antigen) peuvent accélérer l'apoptose des PN, point de contrôle important de la réponse inflammatoire (Chiara et al., 2012). Les CDK 7 et 9 sont impliqués dans la phosphorylation du RNAPol II dans les PN conduisant à la transcription des gènes et à la survie de la cellule (Leitch et al., 2012). Pour sa part, PCNA est un facteur nucléaire impliqué dans la réplication de l'ADN et la réparation des cellules en prolifération ; il a été récemment décrit comme régulateur de la survie des PN (Witko-Sarsat et al., 2010)

Dans la plupart des modèles, l'augmentation de l'apoptose des PN a été associée à la réduction de leur accumulation dans les tissus et le renforcement de l'efferocytose, en parallèle avec une résolution accélérée de l'inflammation. Bien que tous les médiateurs présentés ici partagent de nombreuses actions bénéfiques, ils activent des circuits moléculaires distincts qui modifient l'équilibre des signaux pro-survie et pro-apoptose.



**Figure 12. Implication des PN dans la phase pro-résolutive de l'inflammation.** Equilibre entre les signaux de survie et de mort. D'après El Kebir et al. Cells 2013

### 1.5.2. Phase anti-inflammatoire

Dans cette phase sont principalement impliqués de médiateurs qui modulent et/ou inhibent le recrutement des PN au site inflammatoire (Figure 13) mais aussi des molécules régulatrices de l'activation cellulaire et de l'amplification de la réponse inflammatoire.

Dans cette phase se retrouvent à nouveau les médiateurs lipidiques LXA<sub>4</sub> et RvE1 ; ils sont impliqués dans la réduction/inhibition du trafic cellulaire (El-Kebir and Filep, 2013). LXA<sub>4</sub> diminue la migration des PN vers les tissus inflammatoires par la régulation négative de Mac-1 et la stimulation directe du SOCS-2 (Serhan et al., 2008). La liaison de RvE1 à ses récepteurs inhibe la production de cytokines et la migration des PN au site d'inflammation (Serhan et al., 2008).

D'autres molécules endogènes capables de moduler le recrutement des PN ont été décrites. La **nétrine-1** (une molécule de guidage neuronal) est exprimée par l'endothélium et atténue l'infiltration des PN au cours de la colite et certaines inflammations stériles (Aherne et al., 2012; Rosenberger et al., 2009). La **prostaglandine-D2** (PGD<sub>2</sub>), via son récepteur CRTH2, peut mettre fin au recrutement des PN au cours du sepsis (Ishii et al., 2012). La pentraxine 3 (**PTX3**), une protéine de

la phase aiguë (PRR mais aussi récepteur opsonisant et activateur du complément), peut se lier à la P-sélectine et ainsi atténuer le recrutement des PN (Deban et al., 2010). D'autres inhibiteurs endogènes ont été récemment décrits, ayant en commun la capacité d'interagir avec la  $\beta 2$ -intégrine : le facteur de croissance et de différenciation 15 (GDF15) (Kempf et al., 2011), la protéine régulatrice du développement endothélial (DEL1 ou EDIL3) (Choi et al., 2008) et PILR $\alpha$  (paired immunoglobulin-like type 2 receptor- $\alpha$ ) (Wang et al., 2013).

La sous-unité p40<sup>phox</sup> de Nox2, jouerait aussi un rôle crucial dans la phase de résolution de l'inflammation intestinale (Conway et al., 2012) ; en effet, Nox2 diminue l'expression de CCR1 et augmente celle d'enzymes impliquées dans les modifications des glycanes (comme les fucosyl-transférases, sialyl-transférases) impliqués par exemple dans la synthèse du ligand de la L-sélectine essentielle à la première étape de migration cellulaire (roulement). De la même façon la libération des FRO *via* Nox2 pourrait contribuer à la résolution de l'inflammation, ils peuvent augmenter la libération de TGF- $\beta$ 1 à partir de fibroblastes cultivés et activer la forme latente de cette cytokine par clivage du peptide associé à la latence (LAP) (Sareila et al., 2011).

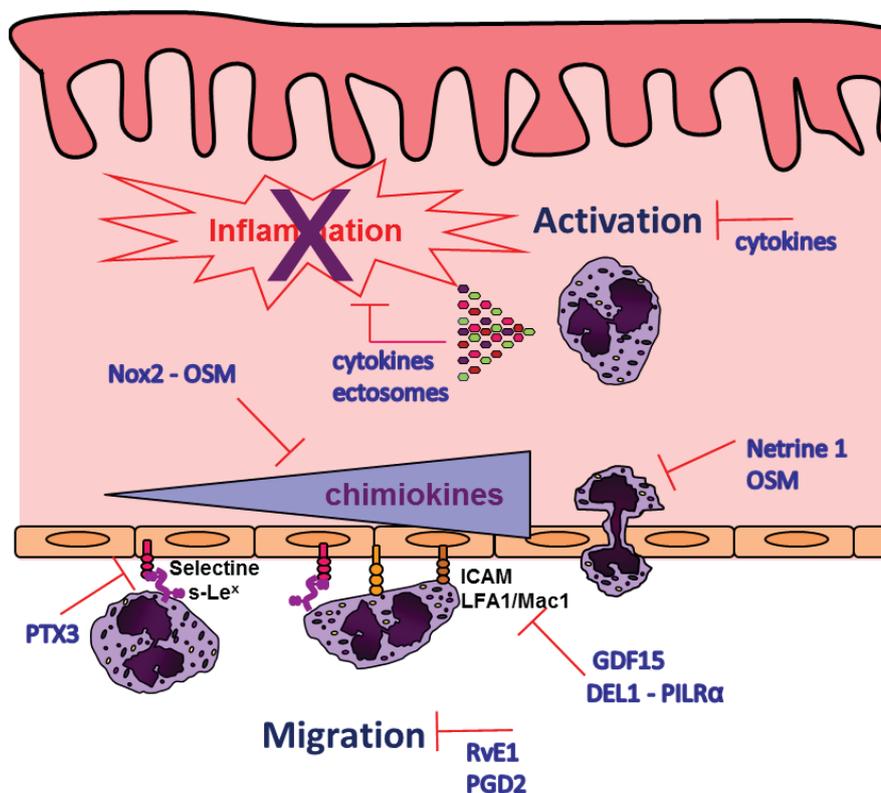


Figure 13. Rôle des PN dans la phase anti-inflammatoire. Cette phase est principalement caractérisée par l'inhibition du recrutement et l'activation des PN.

L'OSM aurait aussi un rôle important. Libérée rapidement au cours de la phase aiguë de l'inflammation, elle peut participer à l'inhibition de l'expression et de la libération de l'IL-1 et de l'IL-8 par les fibroblastes, diminuant ainsi le recrutement des PN aux sites de l'inflammation (Dumas et al., 2012). L'OSM est aussi un puissant inducteur d'anti-protéases permettant de contrôler les effets délétères des protéases du PN et de diminuer la formation des FRO (Grenier et al., 2001; Grenier et al., 1999).

Les PN ont la capacité de piéger et d'inactiver certains chimiokines ou cytokines et ainsi contrôler leur migration et leur activation. Récemment, Basran *et al.*, ont montré la participation des PN dans la régulation de l'inflammation par la séquestration de l'IL-8 (Basran et al., 2013). Ce mécanisme est partiellement dépendant du récepteur et modifié par le contexte inflammatoire ; il est actif dans des modèles d'infection virale mais peu visible dans des modèles d'infection bactérienne. D'autre part, les PN empêchent l'interaction de l'IL-1 avec son récepteur (IL-1R1) par l'expression du decoy-récepteur IL-1R2 (Bourke et al., 2003).

Un mécanisme similaire est induit par la présence de l'IL-10. Elle augmente l'expression et la production de molécules anti-inflammatoires par les PN, comme l'antagoniste du récepteur de l'IL-1, une molécule soluble qui va se lier à l'IL-1R sans induire de signal intracellulaire. (Cassatella et al., 1994). Si la production de l'IL-10 par les PN humains est très peu probable (cf. section 1.4.1. Médiateurs peptidiques: les cytokines et les chimiokines), son implication dans la régulation des PN est majeur (Bazzoni et al., 2010). En effet, l'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire puissante qui régule l'activation et la fonction des cellules immunitaires innées ; elle provient principalement des monocytes/macrophages présents au site inflammatoire. L'IL-10 a la capacité de bloquer sélectivement l'expression des gènes pro-inflammatoires codant pour des cytokines et des chimiokines. L'action de l'IL-10 n'est pas immédiate car les PN expriment très peu de récepteur à l'état basal ; son expression est induit lors de l'activation de la cellule (Bazzoni et al., 2010).

L'IL-27 exprimée par les PN humains au cours du sepsis, exerce aussi des effets régulateurs sur la cellule. Elle diminue la production de FRO et réduit l'activité bactéricide des PN. (Rinchai et al., 2012)

La libération de médiateurs granulaires peut aussi participer à la modulation des cellules environnantes. Les PN sont en effet capables de réguler négativement la

production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes humains activées par *C. albicans* et le LPS, sans affecter l'IL-10 (Gresnigt et al., 2012). Cet effet serait dû à des protéases granulaires, telle que l'ELA, ayant la capacité de dégrader ces cytokines. En utilisant deux modèles murins d'inflammation – modèle d'arthrite induite par le zymosan et modèle d'endotoxémie- ces auteurs ont observé que l'absence de PN est associée à l'aggravation de la maladie et l'augmentation des concentrations de cytokines ; ceci suggère que les PN joueraient un rôle dans la réponse pro-inflammatoire *in vitro* et *in vivo*.

D'autre part, les PN activés peuvent aussi libérer rapidement des ectosomes, microparticules produites par bourgeonnement de la membrane plasmique (Gasser and Schifferli, 2004). Ces microparticules exposent la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de leur membrane et portent un ensemble de protéines issues des PN telles que les molécules majeure d'histocompatibilité I (CMH-I), L-sélectine,  $\beta$ -2 intégrine, l'ELA, la MPO et la PR3. Les ectosomes ont plutôt un effet inhibiteur lors de leurs interactions avec les cellules immunitaires. Ainsi, ils agissent sur les macrophages et les DC activés en diminuant leur sécrétion de cytokines inflammatoires, et sur les monocytes en induisant la production de TGF $\beta$ . (Eken et al., 2008; Eken et al., 2010; Gasser and Schifferli, 2004)

Au cours de leur activation, les PN peuvent exprimer à leur surface le récepteur ILT4, un récepteur inhibiteur stocké dans les granulations (Dr Jeremy Baudhin, communication personnelle). Ses principaux ligands sont les molécules du CMH-I ayant une affinité forte pour l'HLA-G, une molécule du CMH-I non classique. Son induction inhiberait la production de FRO et la phagocytose, *via* l'inhibition de l'activation des Fc $\gamma$ R.

### **1.5.3. Phase de reconstitution tissulaire**

Les PN peuvent également contribuer à la reconstitution des tissus, *via* en particulier l'angiogénèse. Ils produisent et stockent dans leurs granulations des molécules pro-angiogéniques telles que le facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGF-A) (Gaudry et al., 1997) et la métalloprotéinase-9 (MMP-9) (Ardi et al., 2007). Le VEGF est un acteur-clé dans la formation des vaisseaux sanguins mais il est aussi impliqué dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire et le recrutement des PN et d'autres cellules (Ancelin et al., 2004). La fonction pro-angiogénique de la MMP-9 est attribuée à sa capacité à libérer du VEGF et d'autres facteurs de croissance liés à la

matrice extracellulaire, mais aussi à sa capacité à digérer la matrice extracellulaire pour ouvrir la voie à de nouveaux vaisseaux. Les PN sont les seules cellules capables de libérer la MMP-9 de son inhibiteur endogène, TIMP, et donc capables de délivrer la MMP-9 active vers les sites angiogéniques (Ardi et al., 2007).

La capacité pro-angiogénique des PN a été démontrée dans un modèle de lésion de la cornée, où le nombre de cellules infiltrées est corrélé avec l'intensité de l'angiogenèse et la concentration du VEGF (Gong and Koh, 2010). Par ailleurs, une autre étude a montré que les îlots pancréatiques isolés transplantés dans les muscles ne se revascularisent pas chez des souris neutropéniques, tandis que la vascularisation intra-îlot était restaurée après la transplantation chez des souris WT ; les PN recrutés sont donc importants dans le déclenchement de l'angiogenèse (Christoffersson et al., 2010). Dans un travail plus récent, la même équipe propose que les PN recrutés dans les îlots pourraient appartenir à un nouveau sous-type les PN CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup>/CXCR4<sup>hi</sup> (Christoffersson et al., 2012), attirés par le VEGF et capables de produire la MMP-9 permettant la revascularisation du greffon.

Les PN participent à la réparation du tissu pulmonaire agressé *via* l'activation de la signalisation médiée par la  $\beta$ -caténine dans les cellules épithéliales pulmonaires (Zemans et al., 2011).

Enfin, l'HGF est connu pour sa capacité de régénération tissulaire. Par exemple, au cours de l'hépatite aigue, il existe une corrélation entre la libération de l'HGF et l'infiltration hépatique par des PN, ce qui suggère l'implication de ces cellules dans la production de cette cytokine et la reconstitution hépatique au cours de cette pathologie sévère (Grenier et al., 2002; Taieb et al., 2002).

La **résolution de l'inflammation**, ne repose pas seulement sur le catabolisme des médiateurs de l'inflammation et l'abrogation des processus inflammatoires ; elle implique aussi un programme actif et coordonné visant la restauration de l'homéostasie tissulaire et sa réparation. Ce rôle était réservé aux macrophages, mais maintenant de nombreuses études ont montré que les PN participaient activement à cette étape. Ils sont capables de moduler les mécanismes pro- et anti-apoptotiques, l'équilibre entre les signaux de survie et de mort cellulaire, et vont induire des molécules pour renforcer l'efferocytose. Comme les macrophages, les PN produisent des médiateurs qui vont moduler la migration des PN eux-mêmes au site inflammatoire. Enfin, les PN vont jouer

un rôle important dans la réparation tissulaire. Dans sa dernière revue générale, Mauro Peretti, décrit cette coopération cellulaire entre les PN et les macrophages (Ortega-Gomez et al., 2013). Le développement des agents thérapeutiques ayant comme cible les différents mécanismes pro-résolutifs, est un nouvel objectif pour limiter les lésions tissulaires et améliorer la résolution au cours des pathologies inflammatoires.

### **1.6. Sous-populations fonctionnelles de PN**

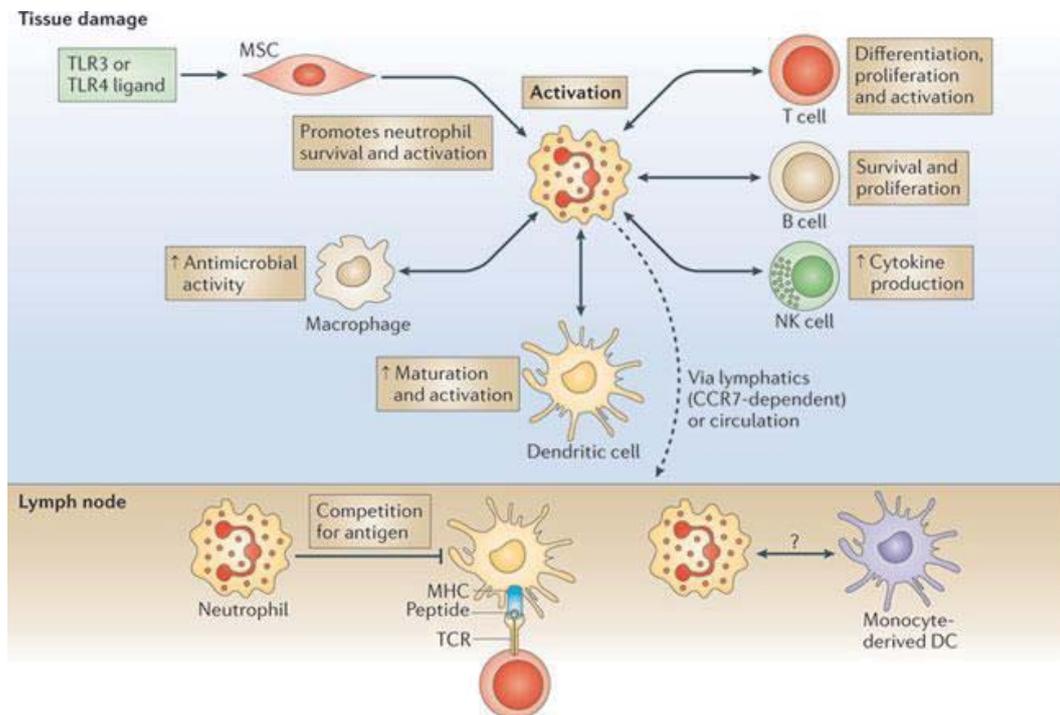
Plusieurs études récentes indiquent qu'il pourrait exister plusieurs sous-populations de PN, comme cela a été décrit pour les monocytes.

Au cours de certains cancers, une population de PN associée aux tumeurs a été décrite, les TAN (tumor associated neutrophil). Selon la présence ou non de TGF $\beta$  local ces PN peuvent acquérir un phénotype pro-tumoral (N2) ou anti-tumoral (N1) (Fridlender et al., 2009). Plus récemment, il a été suggéré l'existence d'une sous-population de PN avec des propriétés pro-angiogéniques, recrutés dans les tissus greffés par le VEGF-A ; ces PN CXCR4<sup>high</sup> ont la capacité de libérer la MMP-9 pour revasculariser le greffon (Christoffersson et al., 2012). Un sous-type distinct de PN pro-inflammatoires, appelés LDG pour « low density granulocytes », a été isolé à partir du sang de patients atteints de lupus (Carmona-Rivera and Kaplan, 2013) ; ces cellules peuvent contribuer à la pathogenèse de la maladie et au développement de lésions tissulaires ; ils ont été aussi décrits dans d'autres maladies inflammatoires (Carmona-Rivera and Kaplan, 2013) et dans les infections par le VIH (Cloke et al., 2012). Cependant, il sera important de déterminer, dans de futurs travaux, s'il pourrait s'agir de PN à différents stades de leur cycle de vie, ou de leur état de maturation.

Il a déjà été noté que, dans les tissus, les PN établissent des communications directes avec des éléments du stroma et d'autres cellules immunitaires comme les macrophages, les DC et les lymphocytes. Dans ce contexte, une population de PN autour de la zone marginale (MZ) des follicules lymphoïdes de la rate a été récemment identifiée et appelée "neutrophiles auxiliaires des cellules B" (N<sub>BH</sub>). Ils activent les cellules B de la MZ et vont promouvoir la commutation de classe des immunoglobulines, l'hypermutation somatique et la production d'anticorps (Puga et al., 2012). De la même façon, les PN peuvent migrer vers le ganglion lymphatique d'une manière CCR7-dépendante et agissent comme des CPA envers les LyT induisant un profil Th1 ou Th17 (Abi Abdallah et al., 2011; Beauvillain et al., 2011). De plus, ils

captent et présentent certains antigènes (Ag) exogènes *via* le complexe CMH-I *in vivo*, induisant la différenciation des LyT CD8<sup>+</sup> naïfs en Ly cytotoxiques (Beauvillain et al., 2007). La capacité des PN à présenter les Ag est largement débattue dans la littérature car ils expriment peu ou pas des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH-II). Geng et al., ont récemment développé *in vitro* une population hybride - appelée PN-DC hybride- ayant les doubles capacités fonctionnelles. *In vivo* ces hybrides ont été détectés dans divers organes au cours des modèles inflammatoires murins (Geng et al., 2013).

Au final, ce chapitre résume les principales capacités fonctionnelles des PN leur permettant d'être au centre des réactions immunitaires. La figure 14 résume les différentes interactions décrites entre les PN et d'autres cellules du système immunitaire. Ces nombreuses interactions mettent en évidence que le PN est une cellule très polyvalente et sophistiquée, permettant de relier l'immunité innée et l'immunité adaptative (Mantovani et al., 2011). Les interactions entre les PN et les DC seront spécifiquement décrites dans le chapitre 4.



**Figure 14. Interactions entre les PN et les cellules des tissus inflammatoires et des ganglions lymphatiques.** Au cours de la réponse inflammatoire, les PN vont communiquer avec les cellules environnantes par interaction cellulaire directe ou bien par libération de médiateurs solubles. D'après Mantovani et al. Nat Rev Immunol 2011



*Chapitre 2 :*  
*Les Neutrophil Extracellular*  
*Traps*

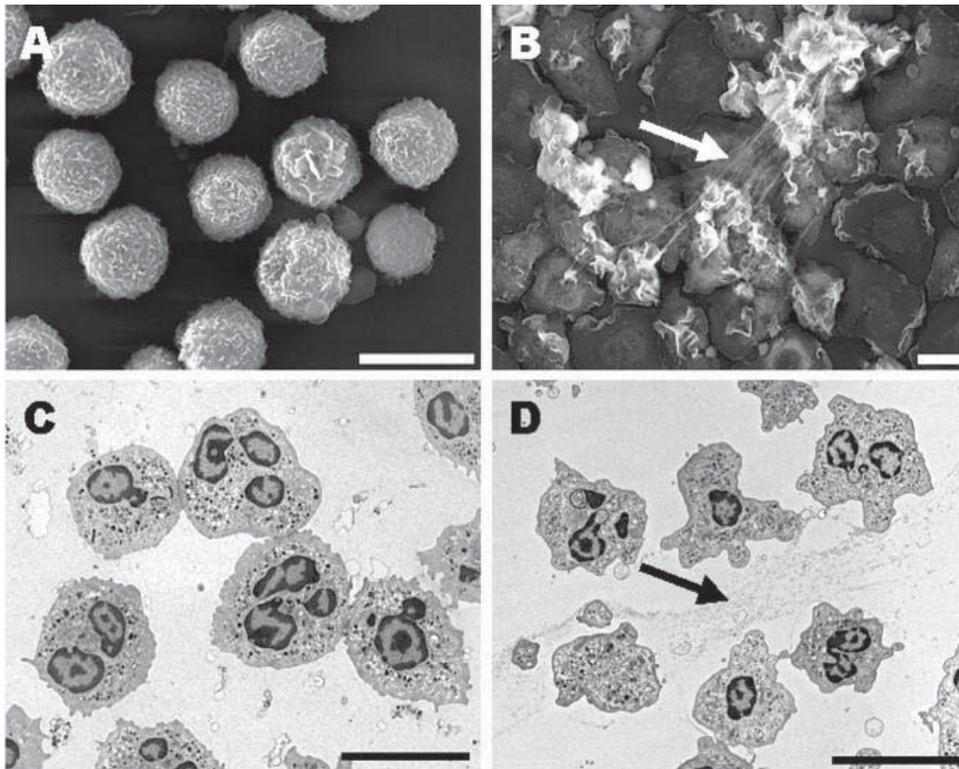


Les PN sont les cellules-clé du système immunitaire inné, en raison de leur rôle particulier dans la défense anti-infectieuse. Ils accomplissent cette fonction grâce à des mécanismes intracellulaires et/ou extracellulaires, comme décrits dans le chapitre précédent. Dans les deux cas, les microorganismes sont tués grâce à l'action combinée de différentes molécules antimicrobiennes stockées dans les granulations cytoplasmiques ou générées *de novo*.

En 2004 l'équipe de Zychlinsky, à Berlin, a décrit un mécanisme extracellulaire original : la libération de Neutrophil Extracellular Traps (NETs). Les NETs, sont des structures composées de fibres de chromatine décondensée associant diverses protéines issues de différents compartiments cellulaires, libérées hors du PN après activation (Brinkmann et al., 2004). Depuis, de nombreux travaux ont été réalisés afin de comprendre les mécanismes cellulaires à l'origine de la production des NETs, ainsi que leur rôle physiologique dans la défense anti-infectieuse. De manière intéressante, leur implication dans la physiopathologie de maladies aussi variées que les maladies auto-immunes, le cancer, les maladies thrombotiques ou le sepsis sévère a été prouvée et ouvre un champ important à de nombreuses investigations (Branzk and Papayannopoulos, 2013; Brinkmann and Zychlinsky, 2012; Cooper et al., 2013; Goldmann and Medina, 2012; Kaplan and Radic, 2012; Lu et al., 2012; Saffarzadeh and Preissner, 2013; Simon et al., 2013)

### 2.1. Historique de la NETose

En 1996, Takei *et al.* décrivent une mort cellulaire atypique de PN traités avec du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), qui présentent une morphologie différente de celle caractéristique de l'apoptose ou de la nécrose. Ils notent que cette mort cellulaire est associée à des changements morphologiques du noyau, nécessite des FRO après activation de la PKC et se termine par la rupture de la membrane cellulaire qui permet la libération dans le milieu extracellulaire du contenu cytoplasmique (Takei et al., 1996); cette observation reste non reproduite ni approfondie jusqu'en 2004 où Brinkmann *et al* définissent les NETs et les *stimuli* responsables de leur production comme le PMA, le LPS ou l'IL-8 (Figure 15). Cette production de NETs est définie comme l'étape ultime d'un processus d'activation des PN pouvant ou pas aboutir à la mort cellulaire ; ce processus est nommé NETose en 2007 (Fuchs et al., 2007).



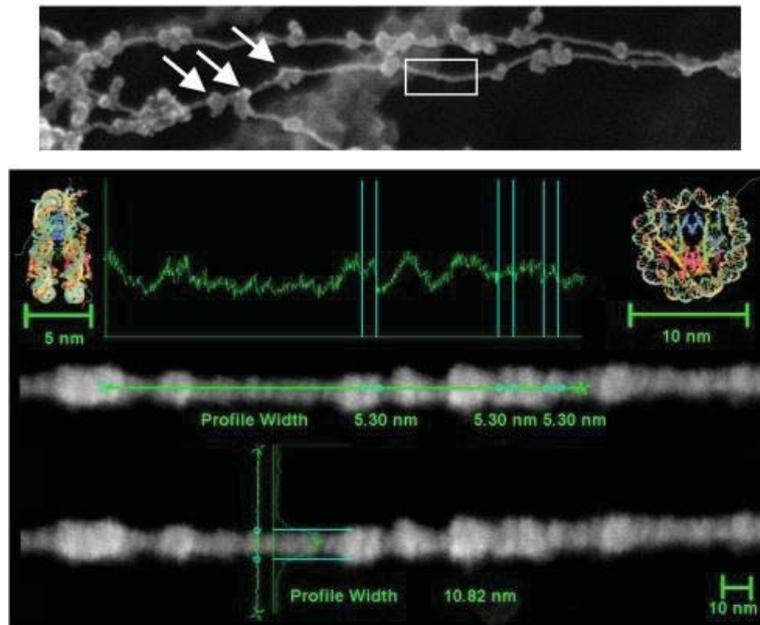
**Figure 15. Morphologie des PN libérant des NETs.** (A) les PN au repos sont ronds et dépourvus de fibres. (B) Après stimulation par 25nM de PMA pendant 30 min, les PN s'aplatissent, présentent de nombreuses protubérances membranaires et libèrent des NETs, indiqués par des flèches en (B) et (D). L'observation des PN par microscopie électronique à transmission montre également la structure des PN au repos (C), et l'apparition des NETs après stimulation avec 10 ng/mL d'IL-8 pendant 45 min (D). Barres d'échelle = 10  $\mu$ m. D'après Brinkmann et al. Science 2004

À la différence de l'apoptose, la NETose n'est pas dépendante de l'activation des caspases, et n'implique ni la fragmentation de l'ADN ni l'exposition de la phosphatidylsérine à la surface cellulaire. Durant la NETose, la chromatine se déplie, les membranes se désintègrent, permettant ainsi le mélange de la chromatine avec des protéines des granulations, du cytoplasme et issues d'autres compartiments cellulaires. L'intégrité de la membrane de la cellule est alors perdue et la chromatine, recouverte d'une grande diversité de protéines du PN est libérée dans le milieu extracellulaire amorçant la formation des NETs (Fuchs et al., 2007).

## 2.2. Structure et composition des NETs

L'ADN enroulé autour des **histones** constitue la **chromatine** et représente l'ossature des NETs, cette structure pouvant être dégradée par la DNase et non par des protéases (Brinkmann et al., 2004). La chromatine se présente sous la forme de

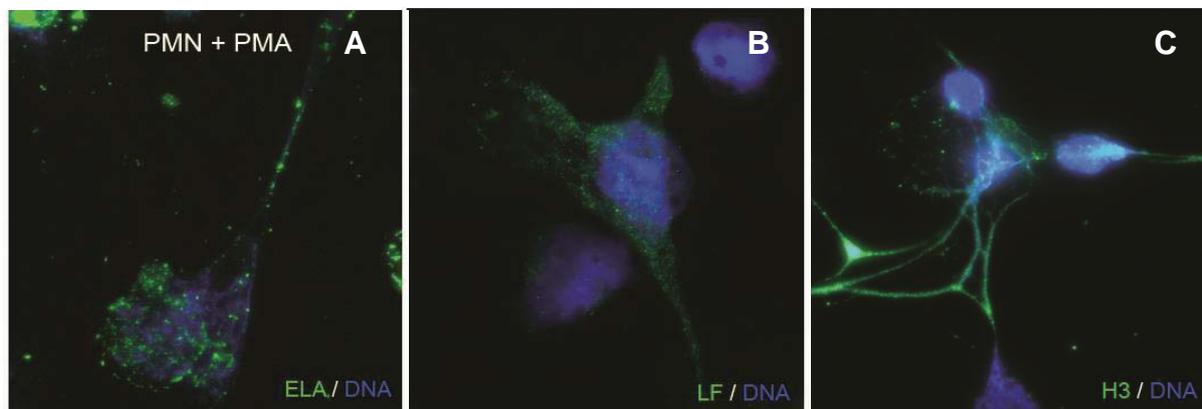
filaments d'environ 15 à 17 nm de diamètre, correspondant probablement à des nucléosomes modifiés. Ces filaments peuvent s'enrouler pour former des câbles qui atteignent jusqu'à 100 nm de diamètre. La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM), permet de visualiser des structures globulaires d'environ 50 nm de diamètre pouvant servir de réceptacle aux protéines (Brinkmann and Zychlinsky, 2007). (Figure 16)



**Figure 16. Analyse des NETs par MEB à haute résolution.** (A) Les NETs se composent de fibres lisses (encadré blanc) et de domaines globulaires de 25 à 50 nm de diamètre indiqués par des flèches (barre d'échelle = 100 nm). (B) L'analyse d'une seule fibre de NETs par MEB montre que son diamètre est de l'ordre de 5 à 10 nm, similaire à celui des nucléosomes. D'après Urban et *al.* PLoS Pathog 2009

En effet, la chromatine des NETs est recouverte de **protéines** issues des différents compartiments du PN (Figure 17). A ce jour, au moins 30 protéines différentes associées aux NETs ont été identifiées (Tableau 3). Les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont les protéines les plus abondantes et représentent 70% des protéines totales (Urban et al., 2009). Au cours de la NETose, ces histones subissent des modifications post-transcriptionnelles, telles que protéolyse et citrullination, qui se traduisent par une diminution du poids de 2 à 5 kDa (Fuchs et al., 2007; Metzler et al., 2011; Urban et al., 2009). En dehors des histones, les NETs expriment des protéines nucléaires, granulaires, cytoplasmiques et membranaires (Marin-Esteban et al., 2012; Munafo et al., 2009; Urban et al., 2009). La plupart des protéines granulaires associées

aux NETs proviennent de granulations azurophiles. L'ELA est la protéine la plus abondante correspondant à environ 5% des protéines totales des NETs ; sont également présentes la CATG, la PR3, les défensines, la MPO, l'azurocidine et le lysozyme. La calprotectine, ou S100 calcium-binding protein, est la protéine cytoplasmique la plus abondante des NETs, correspondant à environ 5% des protéines totales. Les protéines du cytosquelette et des organelles sont également présentes sur les NETs mais en très faible quantité. Enfin, des protéines membranaires comme des composants de Nox2 et la  $\beta 2$  intégrine CD11b/CD18 peuvent aussi s'associer aux NETs. La plupart de ces composants sont des protéines cationiques fortement chargées qui peuvent interagir étroitement avec l'ADN.



**Figure 17. Immuno-marquage des protéines présentes sur les NETs.** L'activation des PN avec du PMA induit la libération des NETs. Ce sont des filets d'ADN (bleu) recouverts de protéines (vert) granulaires comme l'ELA (A) et la lactoferrine (B) ou nucléaires comme l'histone 3 (C). Adaptée d'après Barrientos et al. Front Immunol 2013

La composition en protéines des NETs peut varier selon l'état d'activation ou d'amorçage des PN. Par exemple, en présence d'IFN $\alpha$  ou de sérum de patients riche en IFN $\alpha$ , les NETs produits en réponse au PMA expriment une quantité importante de LL37 et d'HMGB1 (Garcia-Romo et al., 2011; Lande et al., 2011).

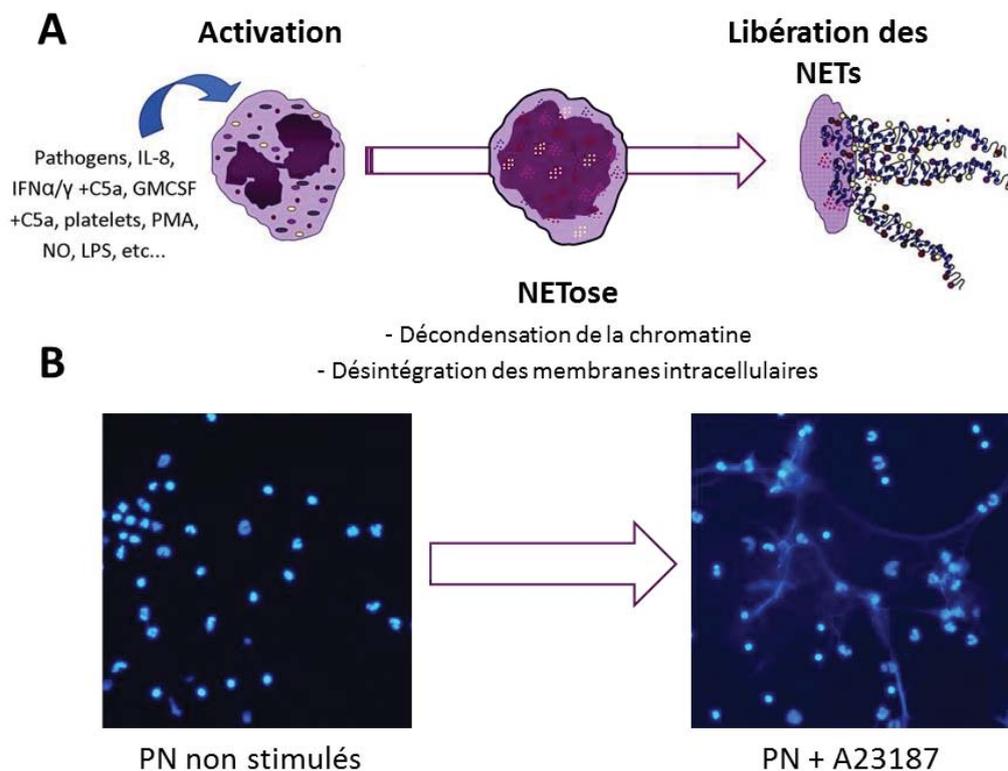
### 2.3. Mécanisme de la NETose

Les mécanismes à l'origine de la libération des NETs ne sont pas encore totalement élucidés. Ils sont étudiés en général dans des modèles *in vitro* utilisant des PN isolés de sang frais humain, ou bien des lignées cellulaires proches des PN humains (HL-60, PLB-985).

Tableau 3. Protéines des NETs identifiées à ce jour

Compartiment	Protéines	Référence
Noyau	Histones: H2A, H2B, H3 et H4	(Urban et al., 2009)
	Myeloid cell nuclear differentiation antigen (MNDNA)	(Urban et al., 2009)
	High-mobility group protein B1 (HMGB1)	(Garcia-Romo et al., 2011)
Granulations	Elastase	(Urban et al., 2009)
	Lactoferrine	(Urban et al., 2009)
	Azurocidine	(Urban et al., 2009)
	Cathepsine G	(Urban et al., 2009)
	Myéloperoxydase	(Urban et al., 2009)
	Protéinase 3	(Urban et al., 2009)
	Lysozyme C	(Urban et al., 2009)
	Défensines 1 et 3	(Urban et al., 2009)
	Gélatinase	(Brinkmann et al., 2004)
	Cathelcidine (LL-37)	(Garcia-Romo et al., 2011)
	Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)	(Brinkmann et al., 2004)
	Pentraxine 3	(Jaillon et al., 2007)
Cytoplasme	SLPI (Secretory leukocyte protease inhibitor)	(Skrzeczynska-Moncznik et al., 2013)
	NSP4 (neutrophil serine protease 4)	(O'Donoghue et al., 2013)
Cytoplasme	S 100 calcium-binding protein A8, A9 et A12	(Urban et al., 2009)
Membrane	$\beta$ 2-intégrine (CD11b)	(Marin-Esteban et al., 2012)
	Nox2	(Munafo et al., 2009)
Cytosquelette	Actine $\beta$ et/ou $\gamma$	(Urban et al., 2009)
	Myosine-9	(Urban et al., 2009)
	Plastine-2	(Urban et al., 2009)
	Cytokératine-10	(Urban et al., 2009)
	$\alpha$ -actinine 1 et/ou 4	(Urban et al., 2009)
Enzymes glycolytiques	$\alpha$ -énolase	(Urban et al., 2009)
	Transcétolase	(Urban et al., 2009)
Peroxisome	Catalase	(Urban et al., 2009)

De nombreux **stimuli** activent la NETose. Les NETs sont formés en réponse aux agents pathogènes, bactéries, virus et parasites. Les médiateurs pro-inflammatoires sont également de forts inducteurs de NETose : le TNF $\alpha$ , l'IL-8, le facteur d'activation plaquettaire (PAF), l'association GM-CSF/C5a/LPS (Brinkmann et al., 2004; Clark et al., 2007; Fuchs et al., 2007; Yousefi et al., 2009). La production de NETs peut également être déclenchée par les plaquettes activées, les cellules endothéliales, les complexes immuns, les fibrilles amyloïdes ou par les cristaux d'acide urique du liquide synovial de patients atteints de goutte (Azevedo et al., 2012; Chen et al., 2012; Gupta et al., 2010; Schorn et al., 2012). De plus, les NETs peuvent être induits de façon très efficace *in vitro* par des agents pharmacologiques comme le PMA, puissant activateur de la protéine kinase C (PKC) dans les PN humains (Brinkmann et al., 2004) ; par contre, la réponse des PN murins au PMA est plus retardée et moins forte (Ermer et al., 2009). L'ionomycine, l'ionophore de calcium A23187, les FRO et les donneurs de monoxyde d'azote (NO) conduisent aussi à la libération de NETs (Fuchs et al., 2007; Kaplan and Radic, 2012; Patel et al., 2010). (Figure 18)



**Figure 18. Libération des NETs par les PN activés.** A. Divers activateurs des PN induisent le processus de NETose qui implique la décondensation de la chromatine et la désintégration des membranes intracellulaires nécessaire à la libération des NETs. B. PN avant et après activation par l'ionophore de calcium A23187 ; le marquage de l'ADN par le DAPI permet de visualiser les NETs

Les processus moléculaires aboutissant à la libération de NETs sont complexes et variés. Le mécanisme le mieux connu est celui qui est déclenché par le PMA, pour lequel les auteurs s'accordent sur l'importance de l'intégrité de l'enzyme **Nox2** et la production de FRO, attestée par l'inhibition de la production de NETs en utilisant des inhibiteurs de Nox2, tels que le diphenyl iodonium (DPI) et des piègeurs de FRO (Fuchs et al., 2007; Hakkim et al., 2011). De plus, les PN déficitaires en Nox2 sont incapables de produire des NETs, que ce soit les PN d'enfants atteints de granulomatose septique (Bianchi et al., 2009), ou bien la lignée PLB-985 gp91phox<sup>-/-</sup> (Marin-Esteban et al., 2012). L'association de la molécule Rac2 est nécessaire à l'assemblage de Nox2 et à la NETose, comme le prouvent des expériences sur des PN murins invalides pour le gène de Rac2 (Lim et al., 2011).

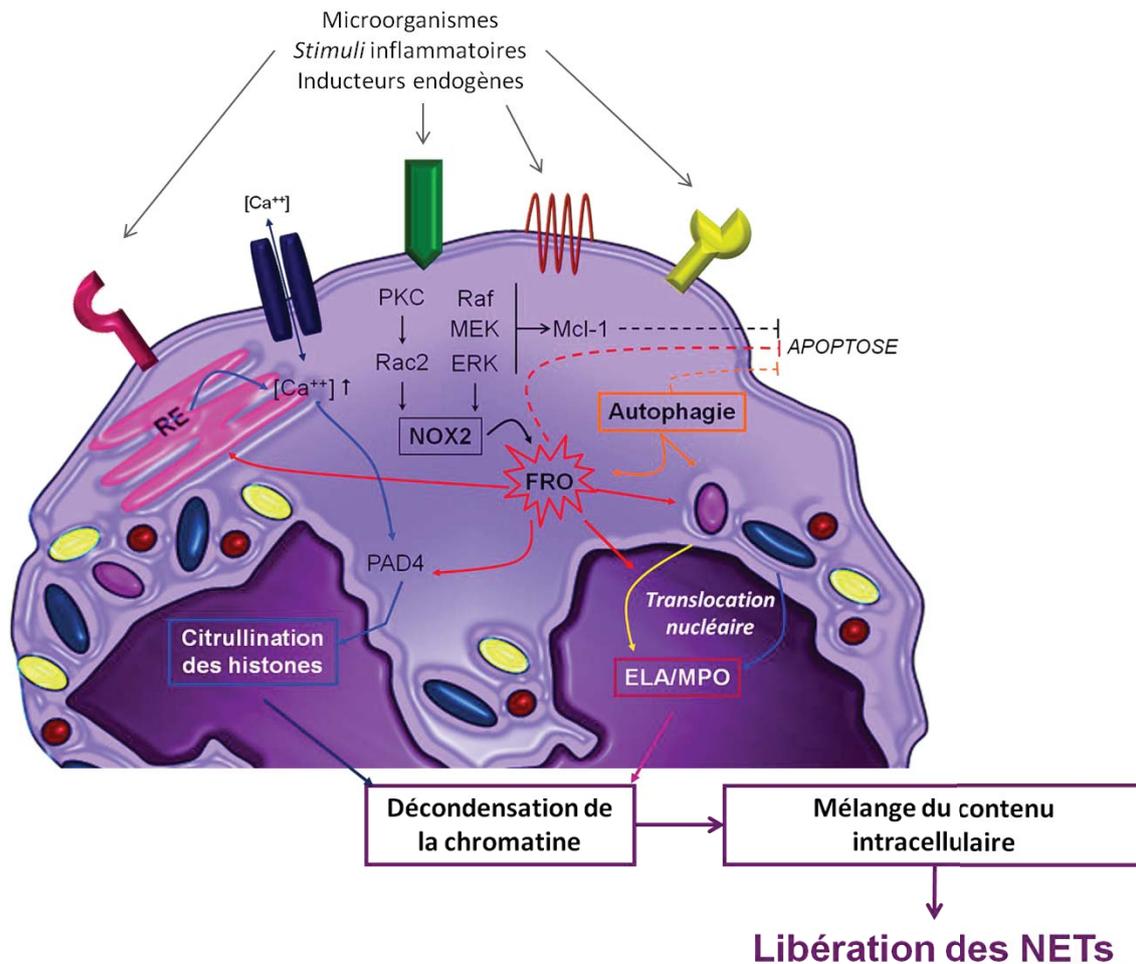
L'engagement de la voie de signalisation **Raf-MEK-ERK**, évènement précoce en aval de l'activation de Nox2, est également nécessaire à la NETose induite par le PMA dans les PN humains. Cette voie régule aussi l'expression de Mcl-1, une protéine anti-apoptotique, suggérant que Raf-MEK-ERK peut inhiber l'apoptose en favorisant la NETose (Hakkim et al., 2011).

Par ailleurs, la décondensation de la chromatine représente un évènement moléculaire majeur de la NETose *via* des modifications post-transcriptionnelles des histones telles que l'acétylation, la méthylation et la citrullination (Bianchi et al., 2011; Goldmann and Medina, 2012). En particulier, la **citrullination**, réalisée par la peptidyl arginine déiminase 4 (**PAD4**), est cruciale pour la décondensation de la chromatine (Goldmann and Medina, 2012; Li et al., 2010; Wang et al., 2009). La PAD4 catalyse la déimination des résidus arginine, qui deviennent des résidus citrulline non chargés, ce qui affaiblit les interactions électrostatiques histone-ADN. La PAD4 est nécessaire à la NETose, l'invalidation de son gène chez la souris ou l'inhibition pharmacologique de son activité conduisant au blocage de la production des NETs (Hemmers et al., 2011; Li et al., 2010). L'activation de la PAD4 est dépendante du calcium et sa fonction est régulée par les différents isoformes de la PKC (Neeli and Radic, 2013; Rohrbach et al., 2012) ; en effet, alors que la PKC $\alpha$  inhibe l'action de la PAD4, l'isoforme PKC $\zeta$  a un rôle essentiel dans son activation et le déclenchement de la NETose. Ceci pourrait représenter un lien entre la libération de FRO *via* la PKC et le mécanisme de la PAD4 dans la production des NETs (Neeli and Radic, 2013).

Deux protéines issues des granulations du PN jouent aussi un rôle important dans la décondensation de la chromatine, l'**ELA** et la **MPO** (Papayannopoulos et al., 2010). Dans une première étape, l'ELA migre vers le noyau où elle participe à la protéolyse des histones et, ainsi, à la décondensation de la chromatine ; puis, la MPO migre aussi vers le noyau pour renforcer cette action, par un mécanisme qui semble indépendant de son activité enzymatique. L'importance de l'ELA, au cours de la NETose, est démontrée par l'inhibition de la formation des NETs par des PN soit invalidés pour le gène codant cette enzyme soit traités par des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques (Papayannopoulos et al., 2010). Le rôle de la MPO dans ce processus reste à élucider. La production de NETs induite par le PMA est diminuée en présence d'inhibiteurs de la MPO (Akong-Moore et al., 2012; Palmer et al., 2012b) ainsi que chez des patients présentant un déficit génétique en cette enzyme (Metzler et al., 2011). Cependant, il a aussi été démontré que l'inhibition de la MPO n'a pas d'effet sur la NETose induite par *P. aeruginosa*, *S. aureus* ou *E. coli* (Parker et al., 2012b). De plus, Chen et al. ont démontré que l'ELA, la MPO et la production de FRO n'étaient pas nécessaires à la production de NETs *in vivo* dans un modèle murin et *in vitro* en réponse à des immuns complexes (Chen et al., 2012; Kaplan and Radic, 2012; Parker and Winterbourn, 2012; Yipp et al., 2012)

Parmi les modifications morphologiques opérées au cours de la NETose, la formation de vacuoles cytoplasmiques est caractéristique de ce processus. Durant les premières minutes après activation des PN, des vacuoles à double membrane possédant des caractéristiques de vésicules autophagiques sont observées dans le cytoplasme, englobant des granulations et des ribosomes en voie de dégradation (Remijnsen et al., 2011). L'**autophagie** et l'activation de Nox2 sont nécessaires pour déclencher la NETose ; l'inhibition d'une des deux voies suffit pour diriger le programme de mort cellulaire du PN vers l'apoptose. La formation d'auto-phagosomes semble également participer à l'expression de certaines protéines sur les NETs, comme HMGB1 et le facteur tissulaire responsable de l'activation de la coagulation (Gardella et al., 2002; Kambas et al., 2012a; Mitroulis et al., 2011).

Même s'il reste encore beaucoup de questions quant aux mécanismes cellulaires et moléculaires qui conduisent à la NETose, de grandes avancées ont été réalisées dans ce domaine ces dernières années, schématisées dans la figure 19.



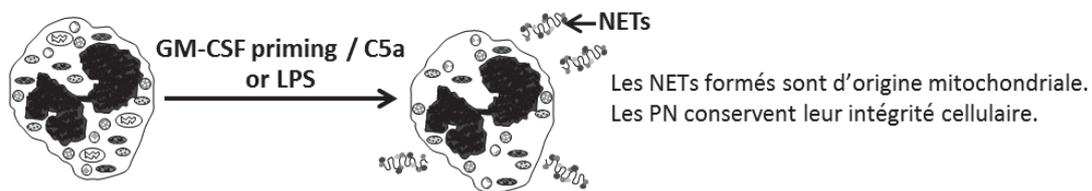
**Figure 19. Représentation schématique des processus moléculaires de la NETose.** Les mécanismes moléculaires engagés au cours de la NETose incluent la production de FRO, l'activation de l'autophagie, la citrullination des histones, la translocation de l'ELA et de la MPO au noyau.

Les premières séries de publications ont conclu que la finalité de la NETose était la mort cellulaire, au même titre que la nécrose ou l'apoptose. Cependant, plus récemment, certains auteurs ont démontré que, parfois, la libération de NETs ne s'accompagnait pas de la mort des PN.

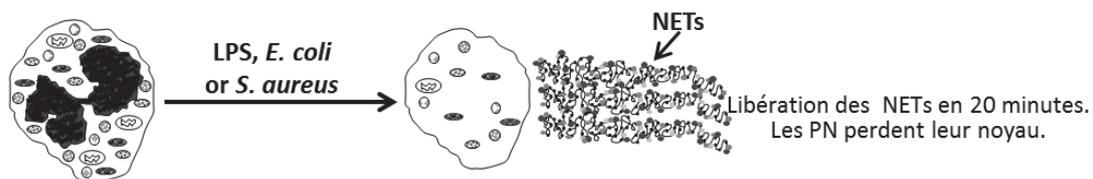
Le premier de ces mécanismes non relié à la mort cellulaire implique la libération de l'**ADN mitochondrial** recouvert de protéines issues des granulations des PN. Pour activer ce processus, les PN doivent d'abord être amorcés par du GM-CSF puis activés avec du LPS ou du C5a. Rapidement, dès 15 minutes, les NETs commencent à être libérés. Ce mécanisme est dépendant de la production de FRO, ne s'accompagne pas de la mort cellulaire et augmente, au contraire la durée de vie des PN. (Yousefi et al., 2009). (Figure 20A)

Au cours du second mécanisme proposé, la production de NETs implique la libération rapide d'ADN nucléaire tout en maintenant certaines **propriétés fonctionnelles** des PN, comme la phagocytose ou la bactéricide. Ce processus a été caractérisé *in vitro* grâce à des co-cultures de PN et de *Staphylococcus aureus*, et *in vivo* dans des modèles d'infections bactériennes systémiques ou cutanées (McDonald et al., 2012; Pilsczek et al., 2010; Yipp et al., 2012). Au cours de ce processus, des filaments courts d'ADN nucléaire sont rapidement transportés vers le milieu extracellulaire *via* des vésicules formées à partir de la membrane nucléaire. Parallèlement, le noyau perd sa morphologie, la chromatine se décondense puis est libérée hors de la cellule sous forme de filets. Ce processus très rapide ne dépend pas de la production de FRO, et permet la visualisation d'ADN intra-vésiculaire 5min après une stimulation bactérienne *in vitro* (Pilsczek et al., 2010). *In vivo*, l'accumulation extracellulaire de ces NETs est détectable par microscopie intra-vitale 20 minutes après l'infection (figure 20B) (Yipp et al., 2012). Ce modèle est dépendant du fragment C3 du complément et du TLR2 pour l'opsonisation et la reconnaissance bactérienne, mais aussi pour le déclenchement de la NETose.

**A Libération d'ADN mitochondrial**



**B Activation *in vivo***



**Figure 20. Libération des NETs sans mort cellulaire associée.** Dans certaines conditions très particulières de stimulation, la formation de NETs n'est pas suivie de la mort cellulaire. A. L'amorçage avec du GM-CSF suivi d'une activation par le C5a ou le LPS conduit à une libération rapide (15 minutes) de l'ADN mitochondrial recouvert de protéines issues des granulations cytoplasmiques. Les neutrophiles conservent leur intégrité et ont une durée de vie augmentée. B. Dans certains modèles d'infection bactérienne rapide (20 minutes), les neutrophiles libèrent leur chromatine recouverte de protéines issues des compartiments granulaires. Les neutrophiles perdent leur noyau mais conservent leurs granulations intactes et peuvent phagocyter et tuer les microorganismes

## 2.4. ETosis : La libération extracellulaire d'ADN par d'autres types cellulaires

La libération de filets extracellulaires (« Extracellular traps » ou ETs) est un phénomène décrit également pour d'autres types cellulaires. Les éosinophiles (Yousefi et al., 2008), les basophiles (Schorn et al., 2012), les mastocytes (von Kockritz-Blickwede et al., 2008), mais aussi des cellules mononuclées comme les monocytes (Webster et al., 2010) et les macrophages (Wong and Jacobs, 2013) sont capables de produire des structures similaires à celles des PN.

### 2.4.1. Eosinophiles

La production d'ETs par les éosinophiles suit un processus similaire à celui décrit pour la libération d'ADN mitochondrial par les PN (Figure 20A) ; il n'implique pas de mort cellulaire et dépend de la production de FRO (Morshed et al., 2012; Yousefi et al., 2008). Après amorçage avec de l'IL-5 ou de l'IFN- $\gamma$ , les éosinophiles expulsent rapidement de l'ADN en réponse à une stimulation par LPS, éotaxine ou C5a (Yousefi et al., 2008). Il a également été rapporté que la lymphopoïétine thymique stromale et *Staphylococcus aureus* sont des *stimuli* forts de la production d'ETs par des éosinophiles adhérents (Morshed et al., 2012).

Dans les ETs issus d'éosinophiles, la présence de plusieurs gènes mitochondriaux, en particulier Co1 (sous-unité du cytochrome oxydase 1), ND1 (sous-unité NADH déshydrogénase 1), ou Cyb (cytochrome b), confirme l'origine de cet ADN (Yousefi et al., 2008). Les protéines des granulations des éosinophiles sont libérées en même temps que l'ADN mitochondrial ; l'absence de protéines cytosoliques, nucléaires, et membranaires est une caractéristique de ces ETs (Yousefi et al., 2012).

Les ETs d'éosinophiles semblent impliqués dans la physiopathologie des maladies inflammatoires de l'intestin (Yousefi et al., 2008), de la peau (Simon et al., 2011) et dans l'asthme (Dworski et al., 2011). Alors que ces structures sont aussi capables de piéger et tuer les bactéries, leur rôle dans les maladies infectieuses est moins clairement établi (Yousefi et al., 2008).

### 2.4.2. Basophiles

Schorn et al, dans leur étude sur l'implication des ETs dans la goutte (maladie chronique des articulations liée à la formation de cristaux d'acide urique), montrent que

ces cristaux sont capables d'induire *in vitro* et *in vivo* la production d' ETs par les basophiles (Schorn et al., 2012). Par contre, ces résultats n'ont pas pu être reproduits en utilisant les inducteurs de NETose plus classiques, comme le LPS (Schorn et al., 2012). Ceci confirme encore une fois la complexité du mécanisme de libération des ETs et l'idée que ce processus est lié fortement au type de *stimulus* utilisé.

### **2.4.3. Mastocytes**

Les mastocytes sont importants dans la défense de l'hôte contre les parasites mais jouent aussi un rôle néfaste au cours maladies allergiques. Parmi les mécanismes utilisés par les mastocytes pour lutter contre les agents infectieux, la formation d'ETs a été évoquée (von Kockritz-Blickwede et al., 2008).

La production d'ETs par les mastocytes est dépendante des FRO et peut s'observer, par exemple, après 15 minutes d'exposition des cellules à *Staphylococcus pyogènes*. Ces ETs formés sont composés d'ADN et d'histones, comme dans le cas des NETs induits par les PN. De plus, ces structures contiennent des protéines issues des granulations mastocytaires comme la tryptase et le CRAMP/LL-37 (von Kockritz-Blickwede et al., 2008). Contrairement aux PN où les NETs peuvent être dégradés par de la DNase, les ETs des mastocytes nécessitent l'action conjointe de la DNase et d'enzymes qui dégradent la tryptase (von Kockritz-Blickwede et al., 2008).

Récemment, il a été montré que le facteur  $1\alpha$  induit par l'hypoxie (HIF- $1\alpha$ ) entraîne la libération de ces ETs par les mastocytes humains et murins (Branitzki-Heinemann et al., 2012). Ce phénomène est probablement important dans les maladies inflammatoires car HIF- $1\alpha$  joue un rôle dans la régulation des PN et des macrophages (Scholz and Taylor, 2013).

### **2.4.4. Monocytes / Macrophages**

L'implication des monocytes et des macrophages dans ce phénomène de libération d'ETs a été évoquée.

Dans un modèle infectieux, il a été montré que, selon le type de bactérie auquel ils sont exposés, les monocytes peuvent mourir rapidement par apoptose ou bien par une mort cellulaire non-apoptotique (Webster et al., 2010). Dans ce cas, les monocytes libèrent des filaments de chromatine en réponse à *Escherichia coli* ou à *Klebsiella*

*pneumoniae*, par un mécanisme associé à l'activation de caspase-1 (Webster et al., 2010).

Dans un autre modèle utilisant des nanoparticules d'or comme *stimulus*, la capacité des monocytes et des macrophages humains à produire des ETs a été décrite, mais cette production est moins efficace que celle des PN (Bartneck et al., 2010).

La libération d'ETs à partir de lignées cellulaires humaines et murines de monocytes/macrophages (U937 et RAW 264.7, respectivement) a été montrée en réponse aux statines, inhibiteurs de la 3-hydroxy 3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase utilisées dans le traitement des hyperlipidémies. L'effet anti-infectieux potentiel décrit pour ces statines serait en rapport avec la capacité accrue de production des ETs par les monocytes/macrophages, mais aussi des NETs par les PN. (Chow et al., 2010). Le mécanisme moléculaire impliqué dans l'effet des statines semble être lié à l'inhibition de la voie des stéroïdes dans les cellules.

Enfin, des études récentes mettent en évidence la formation d'ETs par des macrophages humains infectés par *Mycobacterium tuberculosis*. Ce phénomène nécessite de l'ELA et de l'IFN- $\gamma$  par un mécanisme dépendant d'ESX-1 (Wong and Jacobs, 2013). ESX-1 est un facteur de virulence important dans la pathogenèse de mycobactéries, codant pour un système de sécrétion de protéines et qui participe également au déclenchement d'une voie de mort cellulaire indépendante de la caspase-1.

## 2.5. NETose dans le règne animal et végétal

La NETose semble être un mécanisme de l'immunité innée conservé au cours de l'évolution. En effet, les phagocytes d'autres espèces animales libèrent des filaments de chromatine, comme cela a été démontré chez le bœuf (Aulik et al., 2010), le cheval (Alghamdi et al., 2009), le poisson (Palic et al., 2007), la souris (Ermer et al., 2009) et le chat (Wardini et al., 2010) ; les hétérophiles de poulet (Chuammitri et al., 2009) ont également été évoqués.

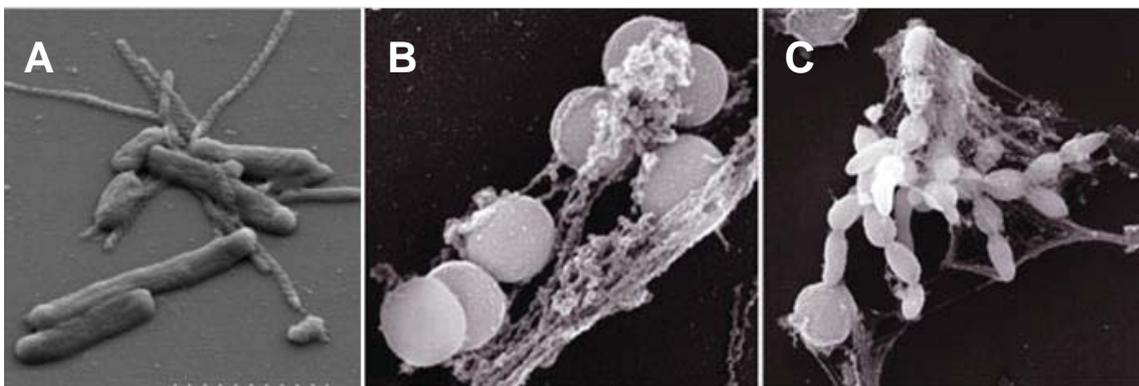
Un mécanisme non classique de production d'ETs par les cellules oenocytoïdes d'un insecte lépidoptère, la fausse teigne de la cire (*Galleria mellonella*), participe à la coagulation de l'hémolymphe et joue un rôle dans la défense anti-infectieuse de cet insecte (Altincicek et al., 2008).

De façon similaire à ce qui est décrit dans les cellules animales, la production d'ETs semble être impliquée dans la croissance et la survie des cellules végétales. En effet, certains travaux ont suggéré que les ETs pouvaient jouer un rôle important dans la défense des cellules de racines de plantes contre les infections fongiques (Hawes et al., 2011; Wen et al., 2009).

## 2.6. Effets microbicides des NETs

Les microorganismes sont les *stimuli* les plus puissants pour activer la production de NETs. En retour, les NETs représentent un outil important de l'immunité innée pour aider à l'élimination de ces agents infectieux (Abi Abdallah and Denkers, 2012; Almyroudis et al., 2013; Arazna et al., 2013; Branzk and Papayannopoulos, 2013; Simon et al., 2013). L'effet microbicide des NETs est probablement le résultat de la combinaison d'au moins trois effets.

Premièrement, les NETs permettent de **piéger les microorganismes** (Figure 21) et ralentissent leur dissémination à partir du site initial de l'infection (Brinkmann et al., 2004). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette liaison ne sont pas encore totalement compris, mais il est possible que les interactions électrostatiques entre les composants cationiques des NETs et la surface anionique des microorganismes jouent un rôle (Brinkmann and Zychlinsky, 2007).



**Figure 21. Micro-organismes infectieux piégés par les NETs.** La libération des NETs permet d'immobiliser les microorganismes au sein des filaments d'ADN. A. *Escherichia coli*; B. *Staphylococcus aureus*; C. *Candida albicans*. Adapté à partir de Marin-Esteban et al. Infect Immun 2012 et Brinkmann et Zychlinsky Nat Rev Microbiol 2007.

Les NETs peuvent aussi **inactiver les facteurs de virulence** des microorganismes pathogènes, qui ont pour fonction de modifier et détruire les cellules de l'hôte. Par exemple, l'ELA des NETs clive les facteurs de virulence de *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, et *Yersinia enterocolitica* (Brinkmann et al., 2004; Weinrauch et al., 2002). Les NETs contiennent également la CATG et la PR3 étroitement liées à l'ELA, qui pourraient cliver d'autres facteurs de virulence (Averhoff et al., 2008).

Enfin, l'activité antimicrobienne des NETs dépend de leur **structure** car ils fournissent une forte concentration locale de protéines à activité anti-infectieuse à proximité directe des microorganismes piégés (Brinkmann et al., 2004). Ces protéines comprennent des enzymes telles que le lysozyme ou les protéases, des peptides antimicrobiens (BPI et défensines par exemple) ainsi que des chélateurs d'ions comme la calprotectine. Les histones, protéines les plus abondantes des NETs, possèdent également une forte capacité à tuer les microorganismes (Li et al., 2007; Rose et al., 1998).

De nombreux travaux ont mis en évidence depuis 2004 la capacité des NETs à participer à l'élimination des agents infectieux, comme les bactéries, les parasites, les champignons et plus récemment les virus. Cependant, des stratégies pour échapper à l'action microbicide des NETs ont aussi été développées par ces agents infectieux. L'ensemble de ces travaux est résumé ci-dessous.

### 2.6.1. Bactéries

Les NETs sont impliqués dans le contrôle et l'élimination des bactéries Gram-positif et Gram-négatif, et elles-mêmes sont souvent de bons inducteurs de NETose. Leurs filaments ont des propriétés bactéricides et bactériostatiques grâce à des protéines qui y sont liées, telles que les protéases, la LF et les histones.

Parmi les bactéries Gram-positif, *Staphylococcus aureus* peut être détruit par un mécanisme dépendant de l'activité peroxydase de la MPO des NETs (Parker et al., 2012a). Les bactéries Gram-négatif, notamment *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* et *Salmonella typhimurium*, peuvent aussi être tuées par les NETs (Brinkmann et al., 2004; Marin-Esteban et al., 2012). Notre équipe a démontré la capacité des NETs issus de PLB-985 différenciées en PN à tuer un *E. coli* entéropathogène (DAEC Afa/Dr) (Marin-Esteban et al., 2012).

Le tableau 4 résume les données actuelles sur les bactéries inductrices de NETose et/ou cibles des NETs.

Tableau 4. . Liste des bactéries piégées et/ou tuées par les ETs

Bactéries	Cellule/Espèce	Piégées	Tuées	Référence
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Neu/Poisson	✓	✗	(Brogden et al., 2012)
<i>Bacillus anthracis</i>	Neu/Humaine	✓	✓ <sup>a</sup>	(Papayannopoulos and Zychlinsky, 2009)
<i>Burkholderia pseudomallei pseudomallei</i>	Neu/Humaine	✓	✓ <sup>a</sup>	(Riyapa et al., 2012)
<i>Escherichia coli</i>	Neu/Bovine	✓	✓	(Grinberg et al., 2008)
	Neu/Humaine	✓	✓	(Marin-Esteban et al., 2012)
Groupe A streptococcus	Neu/Souris	✓	✗	(Buchanan et al., 2006)
	Neu,Mast/Humaine	✓	✗	(Lauth et al., 2009)
Groupe B streptococcus	Neu/Humaine	✓	✗	(Carlin et al., 2009)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Neu/Humaine	✓	✗	(Juneau et al., 2011)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Neu/Humain	✓	✓	(Ramos-Kichik et al., 2009)
<i>Mannheimia haemolytica</i>	Neu/Bovine	✓	✓	(Aulik et al., 2010)
<i>Mycobacterium canettii</i>	Neu/Humaine	✓	✗	(Ramos-Kichik et al., 2009)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Neu/Humaine	✓	✗	(Ramos-Kichik et al., 2009)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Neu/Humaine	✓	✗	(Palmer et al., 2012)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Neu/Souris	✓	✗	(Douda et al., 2011)
	Neu/Humaine	✓	✓/✗ <sup>b</sup>	(Young et al., 2011)
	Neu/Humaine	✓	✗	(Khatua et al., 2012)
<i>Salmonella typhimurium</i>	Neu/Humaine	✓	✓	(Brinkmann et al., 2004)
<i>Shigella flexneri</i>	Neu/Humaine	✓	✓	(Brinkmann et al., 2004)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Neu/Humaine	✓	✓	(Brinkmann et al., 2004)
	Neu/Souris	✓	✗	(Berends et al., 2010)
<i>Streptococcus pneumonia</i>	Neu/Humaine	✓	✗	(Beiter et al., 2006)
				(Wartha et al., 2007)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Mast/Humaine	✓	✓	(von Kockritz-Blickwede et al., 2008)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Neu/Souris	✓	✓	(Casutt-Meyer et al., 2010)
<i>Yersinia pestis</i>	Neu/Souris	✓	✗	(Casutt-Meyer et al., 2010)

Neu : neutrophile ; Mast : mastocytes ; <sup>a</sup>Seulement les bactéries sans capsule ; <sup>b</sup>Les PN de donneurs sains tuent les bactéries mais les bactéries provenant de patients atteints de mucoviscidose sont résistantes aux NETs

### 2.6.2. Parasites

La formation de NETs est également induite lors de l'infection par certains protozoaires comme *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Leishmania* et *Trypanosome* (Table 5).

Tableau 5. Liste des protozoaires piégés et/ou tués par les NETs

Protozoaire	Stades	Espèce	Compromise vital	Evidence	Référence
<i>T.gondii</i>	tachyzoïte	Human souris	oui	<i>in vivo in vitro</i>	(Abi Abdallah et al., 2012)
<i>P.falciparum</i>	trophozoïtes	human	ND	<i>in vivo</i>	(Baker et al., 2008)
<i>E. bovis</i>	sporozoïte	Bovine	oui	<i>in vitro</i>	(Behrendt et al., 2010)
<i>L. donovani</i>	Promastigotes	human	non	<i>in vitro</i>	(Gabriel et al., 2010)
<i>L. major</i>	Promastigotes	human	non	<i>in vitro</i>	(Gabriel et al., 2010; Guimaraes-Costa et al., 2009)
<i>L. amazonensis</i>	Promastigotes	human	oui	<i>in vitro</i>	(Guimaraes-Costa et al., 2009)
<i>L. amazonensis</i>	amastigotes	human	ND	<i>in vitro</i>	(Guimaraes-Costa et al., 2009)
<i>L. chagasi</i>	Promastigotes	human	ND	<i>in vitro</i>	(Guimaraes-Costa et al., 2009)
<i>L. braziliensis</i>	ND	Human	ND	<i>in vivo</i>	(Guimaraes-Costa et al., 2009)

**ND: non déterminé**

Ce sont tous des parasites intracellulaires qui, lors de leur migration vers les cellules de l'hôte vont devenir vulnérables aux médiateurs immunitaires extracellulaires tels que les NETs (Abi Abdallah and Denkers, 2012). Les exemples que nous détaillerons ci-dessous sont les tachyzoïtes des *Toxoplasma*, les trophozoïtes, formes invasives des hématies de *Plasmodium*, et les promastigotes et amastigotes des *Leishmania*.

Lors de l'infection par *Toxoplasma gondii* chez l'homme ou dans un modèle murin, le tachyzoïte induit l'afflux de PN dans les tissus infectés et la libération de NETs qui peuvent limiter la viabilité du pathogène (Abi Abdallah et al., 2012). Dans le cas de *Plasmodium falciparum*, une étude chez des enfants au Niger montre la présence de NETs dans le sang circulant, capables de piéger des trophozoïtes libres et des globules rouges infectés (Baker et al., 2008). De manière intéressante, les auteurs de ce travail rapportent aussi la présence d'anticorps antinucléaires chez ces patients, en rapport avec l'immunogénicité des NETs décrite dans un autre chapitre de ce document.

Dans les biopsies de patients atteints de leishmaniose cutanée peuvent s'observer des régions avec de l'ADN et des histones extracellulaires, suggérant la présence de NETs au cours de cette infection (Guimaraes-Costa et al., 2009). La production de

NETs est déclenchée par les amastigotes de *L. amazonensis* et les promastigotes de *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. donovani* et *L. major*. La production de NETs passe par une voie FRO-indépendante pour la plupart de ces parasites, (Gabriel et al., 2010; Guimaraes-Costa et al., 2009). L'effet destructeur des NETs sur ces promastigotes est limité, ces structures jouant plutôt un rôle de piège en interférant ainsi avec la capacité des parasites à pénétrer dans les cellules de l'hôte. L'activité antimicrobienne des NETs contre les amastigotes reste à établir clairement car des résultats contradictoires existent concernant un effet potentiel cytotoxique des histones (Guimaraes-Costa et al., 2012; Wang et al., 2011).

### **2.6.3. Levures et champignons**

La formation des NETs représente un autre outil des PN, en dehors de la phagocytose, pour lutter contre les infections fongiques. En effet, les NETs ont la capacité *in vitro* de piéger et tuer *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Aspergillus nidalus*, aussi bien sous forme de levures que sous forme d'hyphes (Bianchi et al., 2009; Springer et al., 2010; Urban et al., 2006). L'activité antifongique des NETs a été attribuée à la présence, dans leurs filaments, des calprotectines qui chélatent le zinc et, de manière moins efficace, les ions manganèse nécessaires à la survie des champignons (Bianchi et al., 2011; Urban et al., 2009). Cependant, au cours de modèles d'infection *in vitro* à *Aspergillus fumigatus* ou à *Cryptococcus gattii*, les NETs ont la capacité de piéger et inhiber la propagation de ces champignons, mais n'exercent pas d'effet fongicide (Bruns et al., 2010; McCormick et al., 2010; Springer et al., 2010). La pertinence de cette stratégie antifongique *in vivo* a été suggérée par le travail de Bruns et al. dans un modèle murin d'aspergillose (Bruns et al., 2010); un afflux important de PN dans les poumons infectés est observé associé à la présence abondante de NETs qui piègent le pathogène. Une observation chez l'homme confirme ces données. En effet, la contribution des NETs au contrôle des infections aspergillaires a été démontrée chez un enfant atteint de granulomatose septique familiale. Après reconstitution de l'activité NOX2 par thérapie génique, les PN de l'enfant ont récupéré leur capacité à former des NETs et, de manière concomitante, la capacité à lutter contre une aspergillose invasive par *Aspergillus nidalus*, présente chez le patient avant la thérapie génique (Bianchi et al., 2009).

#### 2.6.4. Virus

Le rôle des PN pour lutter contre les infections virales est encore un sujet de débat (Drescher and Bai, 2013) auquel s'ajoute le rôle potentiel des NETs et leur activité antivirale.

Dans un modèle murin d'infection pulmonaire par le virus *Influenza A*, le virus seul ou bien les cellules épithéliales traitées par le virus induisent la formation de NETs. Par contre, ces NETs ne sont pas capables d'éliminer le virus (Hemmers et al., 2011), et ne confèrent pas non plus de protection contre une infection bactérienne secondaire par *Streptococcus pneumoniae* (Narayana Moorthy et al., 2013). En revanche, les poumons des souris infectées par le virus *Influenza A* présentent un important afflux de PN avec accumulation de NETs, à l'origine d'atteintes pulmonaires sévères liées à la cytotoxicité des NETs (Narasaraju et al., 2011).

Dans un autre modèle viral, il a été démontré que les PN reconnaissent le virus de l'immunodéficiência humaine 1 (VIH1) par l'intermédiaire des TLR-7 et TLR-8. Cette reconnaissance active l'explosion oxydative et la libération de NETs à activité anti-VIH1 dépendante de la MPO et des  $\alpha$ -défensines (Saitoh et al., 2012).

Récemment, il a été suggéré que le recrutement de PN au site d'infection virale et la libération de NETs font partie d'une stratégie de protection par le système immunitaire inné ; les NETs libérés par les PN capturent les particules virales et protègent ainsi les cellules de l'hôte en limitant la dissémination virale (Jenne et al., 2013). Dans ce travail, des NETs sont observés dans la microvascularisation hépatique en réponse à une infection systémique expérimentale par un poxvirus ; la dégradation des NETs par de la DNase intraveineuse se traduit par une augmentation significative du nombre de cellules infectées de l'hôte.

#### 2.6.5. Stratégie pour échapper à l'action des NETs

L'identification de stratégies pour échapper aux NETs chez divers micro-organismes met en évidence la longue coexistence des PN et des agents infectieux au cours de l'évolution, ainsi que l'importance de ce mécanisme pour lutter contre les infections (Arazna et al., 2013).

Parmi ces stratégies, certaines bactéries Gram-positif produisent des DNases et d'autres nucléases extracellulaires dans le but de détruire le squelette d'ADN des NETs.

Ceci a été démontré avec *Staphylococcus aureus* (Berends et al., 2010), des bactéries impliquées dans les parodontites comme *Porphyromonas gingivalis* (Palmer et al., 2012a; Vitkov et al., 2009) et *Streptococcus pneumoniae* (Beiter et al., 2006). Ce dernier exprime à sa surface la nucléase EndA qui, dans un modèle murin de pneumonie, lui permet de démanteler le réseau de NETs et ainsi migrer jusqu'aux voies respiratoires supérieures, puis dans la circulation (Beiter et al., 2006).

Une autre stratégie pour échapper à l'action des composants bactéricides des NETs est la formation d'une capsule, comme décrit chez certains sérotypes de *S. pneumoniae*. La membrane externe de cette capsule étant porteuse de groupements chargés positivement, l'interaction des bactéries avec les filaments d'ADN des NETs est réduite grâce à des répulsions électrostatiques (Wartha et al., 2007). *S. pyogenes* de groupe A (GAS) utilise lui aussi des DNases et la formation d'une capsule pour échapper aux NETs ; le rôle de ces DNases extracellulaires a été démontré *in vivo* et *in vitro* par l'augmentation significative de la virulence de cette bactérie après leur inhibition par l'actine G (Buchanan et al., 2006; Sumbly et al., 2005). Le GAS exprime à sa surface la protéine M, un facteur de virulence essentiel dans sa pathogénèse, capable d'induire la production de filaments d'ADN par les PN et les mastocytes ; cependant cette protéine confère en même temps une résistance aux effets microbicides de la cathélicidine LL37 (Lauth et al., 2009). Le GAS fabrique également une capsule composée d'acide hyaluronique qui n'empêche pas la capture de la bactérie par les NETs mais qui lui permet de survivre en favorisant sa résistance à l'action antimicrobienne de LL-37 (Cole et al., 2010).

Les champignons ont aussi développé des stratégies pour se protéger de l'action des NETs. Par exemple, *Cryptococcus gattii* forme des fibrilles extracellulaires autour de lui, comme une capsule, pour résister à la mort induite par les NETs (Springer et al., 2010). Les conidies d'*Aspergillus fumigatus* protègent leurs sites immunogéniques par recouvrement avec la protéine RodA, inhibant ainsi l'activation de la réponse immunitaire (Carrion Sde et al., 2013) et la production de NETs (Bruns et al., 2010). Pour sa part, *Haemophilus influenzae* se trouve souvent au sein d'un biofilm, qui incorpore même des éléments structuraux des NETs, et lui permet ainsi d'échapper à la phagocytose par les PN et à l'action toxique des NETs (Juneau et al., 2011).

Enfin, les microorganismes peuvent également promouvoir un environnement adverse à la formation de NETs, comme cela a été décrit pour le VIH qui active la

production d'IL-10 par les DC ; cette cytokine anti-inflammatoire inhibe l'activation des PN et, par conséquent, la formation des NETs (Saitoh et al., 2012).

#### 2.6.6. Controverses autour de l'effet microbicide NETs

La relevance biologique de la formation des NETs en tant que stratégie microbicide est discutée depuis peu. Certains auteurs suggèrent que les NETs auraient plutôt un effet bactériostatique, grâce au confinement physique des agents infectieux (Menegazzi et al., 2012; Nauseef, 2012). En effet, la méthode classique utilisée pour mesurer *in vitro* l'effet microbicide des NETs ne permet pas de distinguer entre bactéricidie et agglutination microbienne, c'est à dire, la formation d'une seule colonie par des microorganismes agglomérés par des fibres de NETs (Menegazzi et al., 2012). Dans cette technique, les bactéries sont co-incubées avec des PN ayant libéré des NETs et leur survie est évaluée par le comptage de colonies formées après culture de la totalité des cellules. Les témoins utilisés dans ce type d'expérimentation sont classiquement de la DNase avant l'infection, ou la cytochalasine D pour inhiber la phagocytose (Brinkmann et al., 2004; Marin-Esteban et al., 2012; Urban et al., 2006). Menegazzi et al. montrent que le traitement par la DNase des NETs après l'infection (*S. aureus* ou *C. albicans*) permet de récupérer la totalité des microorganismes intacts, capables de se multiplier ensuite (Menegazzi et al., 2012). Ces auteurs proposent donc que les NETs seraient impliqués majoritairement dans la capture et moins dans l'élimination des pathogènes (Menegazzi et al., 2012; Parker et al., 2012b). Ces travaux récents ouvrent donc la porte à de nouvelles investigations sur ce sujet.

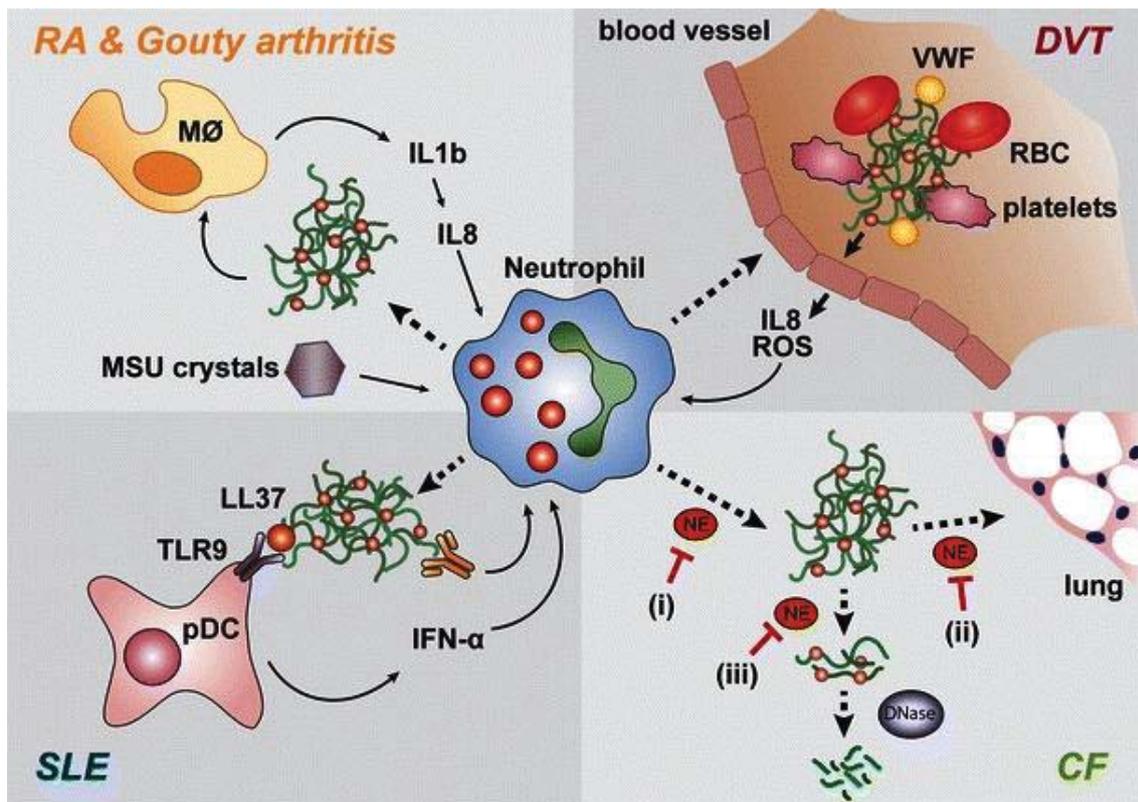
**En conclusion**, la production de NETs est un outil important qui s'ajoute aux autres mécanismes microbicides (phagocytose, production de FRO, dégranulation) pour contrôler les infections. La constatation que divers pathogènes sont capables d'induire des NETs, et le développement de stratégies d'échappement plaident en faveur d'un rôle des NETs dans la réponse immunitaire innée contre les microorganismes infectieux.

### 2.7. Implication des NETs dans la physiopathologie des maladies

La libération de NETs représente une stratégie originale et efficace pour éliminer les agents pathogènes ; cependant, l'exposition à l'extérieur de la cellule de molécules

actives peut être aussi à l'origine de phénomènes délétères comme une réponse cytotoxique, pro-thrombotique, l'induction d'une réponse auto-immune ou la progression tumorale. (Branzk and Papayannopoulos, 2013; Brinkmann and Zychlinsky, 2012; Darrah and Andrade, 2012; Kaplan and Radic, 2012; Radic and Marion, 2013; Simon et al., 2013)

Dans la figure 22 sont représentés les mécanismes proposés dans la littérature concernant le rôle des NETs dans différentes maladies inflammatoires.



**Figure 22. Rôle des NETs dans les maladies inflammatoires.** Au cours de ces dernières années l'implication des NETs dans la physiopathologie de plusieurs maladies inflammatoires a été démontrée. Dans la goutte, le dépôt de MSU conduit à la libération d'IL-1 $\beta$  par les monocytes, l'induction d'IL-8 et le recrutement de PN. Les MSU vont induire la libération de NETs qui stimulent une boucle de production d'IL-1 $\beta$  par les monocytes. Dans la thrombose veineuse profonde (DVT), la fibrine et le facteur VWF favorisent la coagulation et la formation de thrombi dans les vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales activées libèrent de l'IL-8 et des FRO, induisent le recrutement de PN et ainsi déclenchent la formation de NETs. Dans le lupus systémique (SLE), le composant LL-37 des NETs permet à l'ADN d'activer les pDC *via* le TLR9. Les pDC vont sécréter de l'IFN- $\alpha$  qui va amorcer les PN. Cette boucle d'auto-amplification contribue à la progression du lupus. Dans la mucoviscidose (CF), la formation de NETs semble liée à la présence d'elastase.. D'après Branzk et Papayannopoulos, Semin Immunopathol 2013.

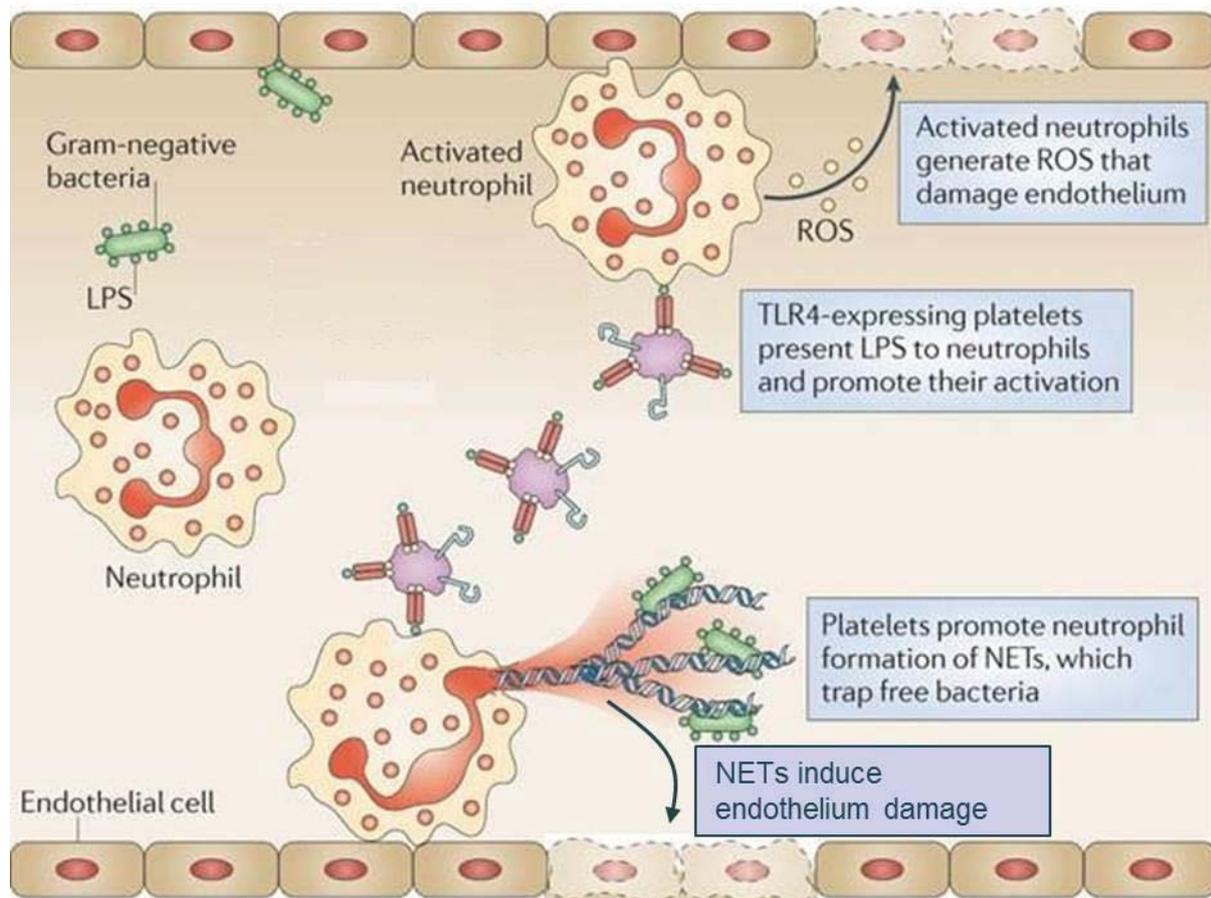
### 2.7.1. Effets néfastes dus à la cytotoxicité directe des NETs

La rétention de médiateurs pro-inflammatoires issus des PN sur les filaments des NETs peut limiter leur diffusion et les possibles lésions tissulaires à distance. Cependant, la forte concentration locale de molécules actives, en particulier cytotoxiques, sur les NETs peut donner lieu à des lésions locales.

Ces effets néfastes ont été particulièrement étudiés au cours du sepsis sévère. Les premières preuves de l'effet délétère des NETs dans le sepsis ont été faites par Clark *et al.* ; la libération de NETs par des PN activés par des plaquettes et du LPS provoque des lésions de l'endothélium sous-jacent *in vitro* et des dommages hépatiques *in vivo* (Figure 23), probablement dus à l'exposition à des protéases et des protéines granulaires (Clark *et al.*, 2007). Plus récemment il a été publié, dans un modèle *in vivo* de septicémie, que la présence de NETs dans le système vasculaire du foie était corrélée à l'atteinte hépatique (McDonald *et al.*, 2012). Cependant, la formation de NETs est nécessaire pour contrôler la dissémination des pathogènes, cela a été démontré dans un modèle murin de septicémie (Meng *et al.*, 2012). L'administration de DNase chez ces souris montre une progression du sepsis avec augmentation de la mortalité, de la dissémination bactérienne et de l'infiltration tissulaire en PN, ainsi qu'une élévation des concentrations circulantes d'IL-6.

L'accumulation de NETs a aussi été associée à d'autres pathologies inflammatoires telles que la pré-éclampsie (Gupta *et al.*, 2007) et dans différentes pathologies pulmonaires liées aux PN, y compris les atteintes pulmonaires aiguës (Thomas *et al.*, 2012), la mucoviscidose (Manzenreiter *et al.*, 2012) et l'asthme allergique (Dworski *et al.*, 2011). Ces données particulièrement importantes sur le poumon font l'objet d'un paragraphe détaillé plus loin.

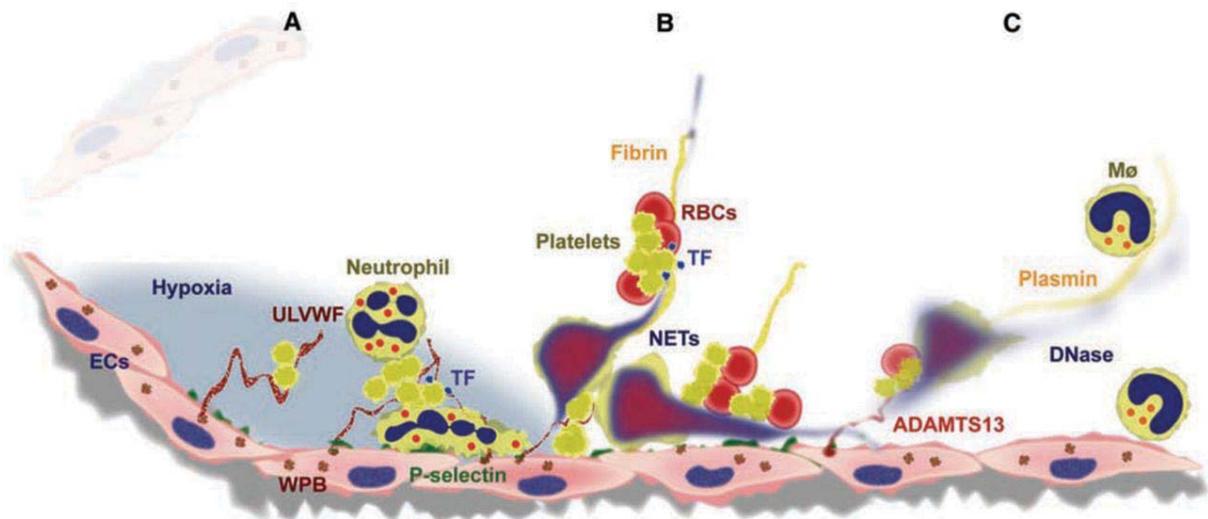
Les protéases et les histones des NETs sont à l'origine de leur effets cytotoxiques sur les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. Saffarzadeh *et al.*, ont identifié l'ELA et les histones comme responsables du dommage tissulaire (Saffarzadeh *et al.*, 2012). L'intégrité de l'épithélium intestinal, modélisé par les cellules Caco2-T, est aussi affecté par la présence de NETs (Marin-Esteban *et al.*, 2012), ainsi que les alvéoles et l'endothélium pulmonaire dans un modèle *in vitro* et *in vivo* d'infection virale (Narasaraju *et al.*, 2011).



**Figure 18. Rôle des NETs au cours du sepsis.** Les plaquettes exprimant TLR4 sont activées par le LPS de bactéries Gram (-) ; elles vont adhérer aux PN et induire la production de FRO (ROS) et de NETs pour lutter contre l'infection, mais ces phénomènes peuvent aussi induire des dommages de l'endothélium. Adaptée d'après Semple et *al.* Nat Rev Immunol 2011

### 2.7.2. Implication des NETs dans les maladies thrombotiques

L'activité pro-thrombotique des NETs est due à leurs effets sur l'activation de la coagulation, selon plusieurs mécanismes. D'une part les NETs fournissent une surface qui permet l'activation de la voie de contact (Fuchs et al., 2010), d'autre part l'endothélium endommagé par les NETs libère le facteur tissulaire qui va activer la voie extrinsèque de la coagulation (Kambas et al., 2012b). L'ELA et la CATG, présentes sur les NETs, potentialisent cette dernière voie ; elles peuvent de plus dégrader certains des inhibiteurs endogènes de la coagulation (Fuchs et al., 2010). Les NETs possèdent donc un potentiel pro-thrombotique qui a été mis en évidence dans différents modèles animaux *in vivo* et chez l'homme au cours de la thrombose veineuse profonde (Brill et al., 2012; van Montfoort et al., 2013) et des anévrismes abdominaux liés à des infections (Delbosc et al., 2011). (Figure 24)



**Figure 24. NETs et développement de la thrombose veineuse profonde.** L'endothélium activé va libérer du facteur von Willebrand (VWF) et de la P-sélectine qui vont intervenir dans l'adhésion des plaquettes et des PN (A). Les plaquettes activées libèrent des microparticules qui contiennent du facteur tissulaire à l'origine de la génération de thrombine. Les plaquettes, l'endothélium activé ou d'autres *stimuli* locaux induisent la formation de NETs (B). Les NETs vont favoriser l'adhérence des plaquettes et des hématies, promouvoir la formation de fibrine, et exacerber l'activation des plaquettes et de l'endothélium. D'après Fuchs T et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012.

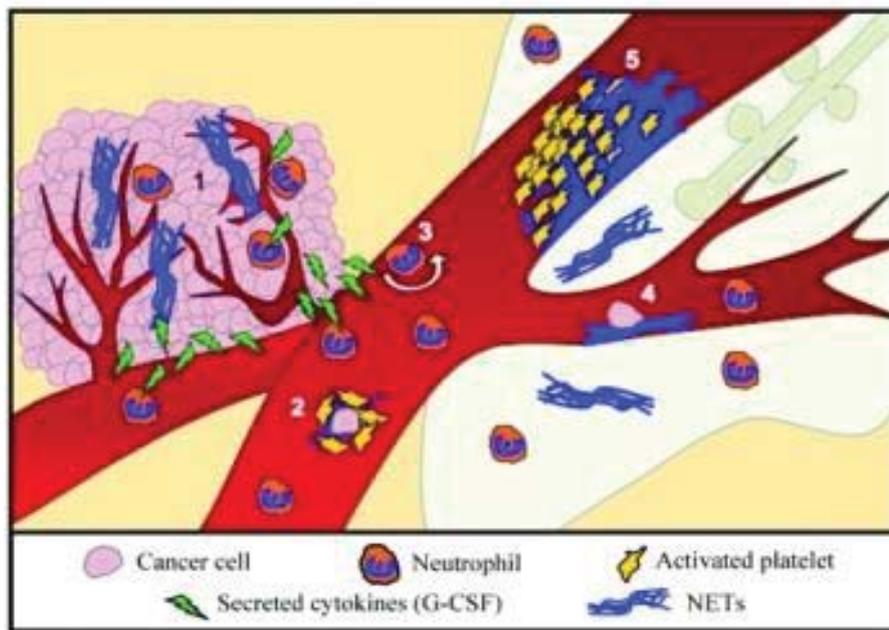
Dans le modèle de thrombose veineuse profonde, les histones et l'ADN prédominent dans les thrombus des zones riches en globules rouges plutôt que dans les régions riches en plaquettes (Brill et al., 2012). Les conditions de stase ou de perturbation de la circulation sanguine sont associées à l'activation des cellules endothéliales et peuvent promouvoir la coagulation extrinsèque dépendant du facteur tissulaire. L'association du facteur tissulaire avec des NETs pourrait induire la génération de thrombine et la formation de caillot de fibrine sur les sites riches en PN ; la thrombine active pourrait conduire à une augmentation de l'activation plaquettaire (van Montfoort et al., 2013).

Les NETs sont aussi observés au cours des microangiopathies thrombotiques (TMA, pour *Thrombotic microangiopathies*) caractérisées par une thrombopénie, agrégation plaquettaire, des lésions mécaniques des globules rouges et des atteintes tissulaires dues à l'ischémie (Fuchs et al., 2012). Ces patients ont de l'ADN et des histones circulants potentiellement issus des NETs. De plus, une forte corrélation existe entre les concentrations de S100A8/A9, de MPO et d'ADN plasmatiques au cours de la

phase aiguë de la maladie. L'implication des NETs dans la physiopathologie du TMA est donc proposée ; ces biomarqueurs permettraient de prévoir le risque de développer, par exemple, une microangiopathie thrombotique post-transplantation (Arai et al., 2013).

### 2.7.3. Rôle des NETs dans le cancer

Les patients atteints de cancer présentent souvent un état d'hypercoagulabilité. Récemment, une étude a identifié la chromatine extracellulaire libérée par la génération de NETs comme un acteur-clé dans la thrombose associée au cancer (Demers et al., 2012). Les cellules des tumeurs solides et les cellules hématopoïétiques au cours des leucémies produiraient un facteur capable d'amorcer les PN et la formation de NETs. Ainsi, les cancers vont créer un environnement qui prédispose les PN à libérer des NETs. (Figure 25)



**Figure 25. Rôle NETs dans la progression tumorale.** Les neutrophiles activés infiltrant les tumeurs peuvent libérer des NETs et affecter la croissance et l'angiogénèse (1). La génération de NETs dans la circulation pourrait protéger les cellules métastatiques (2). Les NETs pourraient également activer l'endothélium et augmenter le roulement et l'adhérence des PN (3) ou adhérer à l'endothélium et favoriser l'immobilisation de cellules métastatiques (4). Enfin, l'adhérence des NETs dans le système vasculaire peut favoriser la thrombose (5). D'après Demers et Wagner, *Oncoimmunology* 2013

Une étude rétrospective récente chez des patients atteints du sarcome d'Erwing suggère l'implication des NETs dans le maintien du processus tumoral. En effet, une

co-localisation de PN et de NETs est observée dans les biopsies de patients en rechute précoce après transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques. Ces auteurs font l'hypothèse que les NETs auraient un rôle pro-tumoral en favorisant, en particulier, les métastases. La présence de NETs pourrait constituer un marqueur pronostique dans le suivi du sarcome d'Erwing et peut-être d'autres cancers (Berger-Achituv et al., 2013)

Les NETs pourraient aussi être impliqués dans le phénomène de métastase, en facilitant l'extravasation des cellules tumorales par un mécanisme dépendant des protéases et des molécules d'adhérence (Demers and Wagner, 2013; Fuchs et al., 2010). Une autre preuve de la participation des NETs dans les processus métastatique a été décrite chez des patients atteints de cancer et d'infection post-opératoire (Cools-Lartigue et al., 2013). Dans ce travail, la capacité des NETs à piéger les cellules tumorales a été démontrée *in vitro* et *in vivo*. Les auteurs suggèrent que l'existence d'une infection post-opératoire chez ces patients va induire l'activation des PN et la production de NETs capables de piéger les cellules tumorales et favoriser leur adhérence dans des organes distaux du site de la tumeur. La survie de ces cellules pourrait conduire à la formation de nouvelles masses tumorales.

Ces résultats très récents sont en faveur de l'implication des NETs dans la progression tumorale et apportent de nouvelles connaissances sur la dichotomie pro- et anti-tumorale des PN. La compréhension du fonctionnement des NETs au cours du cancer est un champ d'investigation nouveau et majeur qui pourrait conduire à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

#### 2.7.4. Rôle des NETs dans l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique et sévère qui affecte l'endothélium artériel. Les plaques d'athérome sont infiltrées par des leucocytes, principalement par des macrophages, lymphocytes et pDC (Drechsler et al., 2011). Les PN ne sont pas abondants dans ces lésions, mais des études récentes démontrent des corrélations entre ces lésions et la présence de NETs chez l'homme et chez la souris (Doring et al., 2012; Drechsler et al., 2011; Megens et al., 2012). Ces NETs peuvent donc exercer une action toxique locale sur les cellules endothéliales et participer aux lésions. Chez la souris, des structures extracellulaires où l'ADN et la protéine CRAMP sont co-localisés sont présentes dans les zones nécrotiques des plaques d'athérome

(Doring et al., 2012), et dans la zone luminale de ces lésions (Megens et al., 2012). Ce complexe ADN/ CRAMP active les pDC locales *via* TLR9 et induit la production d'IFN $\alpha$  qui potentialise la capacité des PN à produire des NETs. De plus, au cours de l'athérosclérose, des auto-anticorps circulants anti-ADN sont présents. Les complexes immuns formés peuvent, en retour, activer la formation des NETs. Il semble donc que les NETs contribuent à l'athérosclérose, ajoutant une composante auto-immune originale à cette maladie. (Doring et al., 2012)

### **2.7.5. Rôle des NETs dans les atteintes pulmonaires**

Le poumon semble être, à l'heure actuelle, un des organes-cibles les plus touchés par les conséquences du phénomène de NETose. La présence de PN et la libération de NETs ont été décrits dans de nombreuses maladies pulmonaires où ils sont impliqués dans le développement de lésions tissulaires. Une mauvaise régulation de la production de NETs, leurs effets toxiques et leur participation dans un déficit de la résolution de l'inflammation sont en cause. En particulier, la protéine du surfactant SP-D se lie physiologiquement aux NETs et favorise leur élimination par les macrophages ; en cas de défaut de surfactant, une accumulation délétère de NETs pourrait s'observer. Une revue générale récente fait le point sur l'implication des NETs dans les pathologies pulmonaires. (Cheng and Palaniyar, 2013)

#### **2.7.5.1. La mucoviscidose**

La mucoviscidose est une maladie autosomale récessive due à une mutation dans le gène codant pour le CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Rowe et al., 2005). L'insuffisance respiratoire chronique progressive est caractérisée par une obstruction pulmonaire par de grandes quantités de *mucus*, des infections bactériennes (en particulier par *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) et une inflammation dominée par la présence de PN (Hauser et al., 2011; Ratjen et al., 2005).

Des NETs sont présents dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose et leur abondance contribue à la viscosité du *sputum* (Manzenreiter et al., 2012). Un traitement par DNase recombinante humaine (rhDNase) réduit les exacerbations pulmonaires sans effet notable sur les infections, et améliore la fonction pulmonaire chez certains patients, en liquéfiant le *sputum* et facilitant le dégagement

muco-ciliaire (Fuchs et al., 1994; Papayannopoulos et al., 2011; Ratjen et al., 2005). Par contre, la rhDNase pourrait augmenter les activités protéolytiques des enzymes liées aux NETs (ELA, CATG ou PR3 en particulier) et par conséquent endommager le tissu pulmonaire (Dubois et al., 2012). De plus, l'ELA va induire la dégradation du CFTR favorisant le développement de la maladie (Le Gars et al., 2013). Il a donc été suggéré d'utiliser d'autres nucléases thérapeutiques qui peuvent diminuer la viscosité du *mucus* par une digestion partielle de l'ADN, tout en maintenant l'activité protéase liée aux NETs (Papayannopoulos et al., 2011). Ces perspectives thérapeutiques sont de la plus haute importance dans cette maladie chronique très sévère.

#### ***2.7.5.2. L'atteinte pulmonaire aiguë (ALI) et le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA)***

Les atteintes inflammatoires pulmonaires aiguës (ALI, acute lung injury), d'origine infectieuse ou non, peuvent se manifester de manière variée et sont associées à une atteinte de la membrane alvéolo-capillaire induisant un œdème pulmonaire. Au cours du SDRA, la forme la plus sévère d'ALI, des lésions de l'épithélium pulmonaire sont associées. Ces atteintes sévères sont en rapport avec un infiltrat intra-pulmonaire de PN activés ; l'implication des NETs a été évoquée récemment (Zhou et al., 2012)

Le rôle des NETs dans l'évolution vers l'ALI a été décrit au cours de modèles d'infections bactériennes (Barletta et al., 2012; Douda et al., 2011b; Li et al., 2010), fongiques (Bruns et al., 2010; Urban et al., 2009) ou virales (Narasaraju et al., 2011; Ng et al., 2012). Mais, les NETs ont aussi été impliqués au cours d'ALI d'étiologie non-infectieuse comme l'œdème pulmonaire lésionnel post-transfusionnel (TRALI) (Caudrillier et al., 2012; Thomas et al., 2012). Les NETs sont détectés dans le plasma de ces patients, ainsi que des anticorps dirigés contre l'alloantigène 3a du neutrophile humain (HNA-3a), dans des formes sévères de cette maladie ; de manière intéressante, il est montré que ces anticorps sont capables d'induire la NETose des PN (Thomas et al., 2012).

Les plaquettes joueraient un rôle crucial dans l'activation des PN et la production des NETs chez les patients atteints d'ALI. Au cours de certaines infections, il a été montré que le LPS active les plaquettes *via* TLR4 ; ces plaquettes activées migrent ensuite vers les poumons où elles adhèrent aux PN et induisent la NETose (Caudrillier et al., 2012; Clark et al., 2007). Dans un modèle murin, la déplétion en PN et en

plaquettes protège les animaux contre une évolution vers le TRALI ; un pré-traitement par aspirine ou pour l'inhibiteur de la glycoprotéine plaquettaire IIb/IIIa empêche l'activation plaquettaire, diminue la formation de NETs et le développement de l'atteinte pulmonaire (Looney et al., 2009). Le blocage des NETs par un anticorps anti-histone ou leur dégradation par la DNase 1, sont également protecteurs contre le TRALI (Caudrillier et al., 2012; Thomas et al., 2012). Ces données récentes suggèrent, là encore, que les NETs pourraient constituer des cibles thérapeutiques prometteuses au cours des différentes formes d'ALI.

### **2.7.5.3. L'asthme**

L'asthme est une maladie fréquente due à une inflammation chronique des voies respiratoires entraînant des épisodes d'obstruction bronchique potentiellement sévères. Parmi les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'asthme, les PN semblent jouer un certain rôle, attesté par la sévérité de l'état des patients dont les expectorations sont plus riches en PN qu'en éosinophiles et par leur résistance à la corticothérapie (Agache et al., 2012).

L'implication d'« extracellular traps » a été suggérée en raison de l'existence d'ADN extracellulaire dans les biopsies bronchiques d'asthmatiques allergiques ; cet ADN provenait essentiellement des mitochondries d'éosinophiles, mais aussi des PN (Dworski et al., 2011). Le rôle des EETs et des NETs dans les lésions tissulaires au cours de l'asthme est donc encore peu connu. En particulier l'importance de la composante allergique est évoquée, notre équipe a fait l'hypothèse du déclenchement de la NETose au cours des réactions allergiques immédiates (ces travaux sont en cours).

### **2.7.6. Rôle des NETs dans les maladies auto-immunes**

Les NETs représentent une plateforme exposant une grande diversité de molécules intracellulaires correspondant à des Ag du Soi. Dès leurs premières découvertes, Brinkmann et al ont fait l'hypothèse que les NETs pourraient être potentiellement responsables d'une rupture de la tolérance du système immunitaire envers ces Ag du Soi (Brinkmann et al., 2004). Depuis, cette hypothèse a été vérifiée dans plusieurs maladies auto-immunes au cours desquelles des auto-anticorps contre des composants des NETs ont été mis en évidence.

### 2.7.6.1. Les vascularites auto-immunes

Les NETs sont impliqués dans la physiopathologie des vascularites associées à la présence d'anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA), dirigés contre la PR3 ou contre la MPO (Diamantopoulos, 2013; Witko-Sarsat, 2013); ces enzymes sont stockées dans les granulations des PN mais sont également associées aux NETs et exprimées à la surface des PN amorcés. Les ANCA, isolés à partir de sérums de patients induisent la libération de NETs par les PN amorcés. De plus, l'expression des cibles des ANCA par les NETs peut induire, en retour, la production de ces auto-anticorps, créant ainsi une boucle d'amplification de la réponse auto-immune. En parallèle, les NETs peuvent être piégés dans les petits vaisseaux et participer aux lésions endothéliales caractéristiques de ces vascularites. L'analyse par microscopie à fluorescence des biopsies rénales de patients atteints de vascularites à ANCA met en évidence la présence de NETs dans les lésions glomérulaires endothéliales et interstitielles. Récemment, le mécanisme de pathogénicité des NETs au cours des vascularites à ANCA a été identifié (Sangaletti et al., 2012). Ces auteurs ont montré que des cellules dendritiques myéloïdes chargées *ex vivo* avec des NETs deviennent activées et capables d'induire, chez la souris, une vascularite auto-immune avec production d'ANCA, accompagnée de lésions du parenchyme rénal et pulmonaire. L'immunogénicité des NETs dans ce modèle est dépendante de l'intégrité de l'ADN. Les NETs ont également été identifiés comme étant capables d'amorcer directement la réponse des LyT requise pour une réponse humorale efficace, en diminuant le seuil d'activation du TCR (Tillack et al., 2012). De même, le propylthiouracil (PTU) - un médicament antithyroïdien - est impliqué dans les vascularites à ANCA de type MPO. En effet, le PTU semble induire une conformation particulière des NETs, les rendant inaccessibles à leur dégradation par la DNase I, *in vitro* ; l'immunisation de rats avec ces NETs modifiés entraîne la production d'ANCA de type MPO *in vivo* (Nakazawa et al., 2012).

### 2.7.6.2. Le lupus érythémateux systémique

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie auto-immune caractérisée par la présence d'auto-anticorps principalement dirigés contre des Ag nucléaires, en particulier l'ADN double brin et différentes protéines du noyau.

L'immunogénicité des Ag du Soi associés aux NETs est susceptible d'être

modifiée par la présence de plusieurs signaux de danger au sein de cette structure. Récemment, des anticorps dirigés contre une protéine des NETs, la cathelicidine LL-37, ont été mis en évidence au cours du lupus (Dorner, 2012; Garcia-Romo et al., 2011). La présence de LL-37 et de HMGB-1 sur les NETs augmente l'immunogénicité de l'ADN et des histones. Ces NETs immunogènes activent les récepteurs TLR-9 des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) induisant ainsi la production d'IFN $\alpha$ . Celui-ci va amorcer les PN et augmenter leur efficacité à produire des NETs en réponse aux complexes immuns circulants. De plus, les Ag du Soi associés aux NETs (ADN, ribonucléoprotéines, histones ...) peuvent intensifier la production d'auto-anticorps spécifiques, augmentant ainsi le nombre de complexes immuns circulants activateurs de NETose (Garcia-Romo et al., 2011; Lande et al., 2011; Villanueva et al., 2011). Cette boucle d'amplification intense et complexe décrite chez l'homme a été confirmée récemment chez la souris. En effet, les complexes ADN/CRAMP (homologue murin de LL37) activent la production d'IFN $\alpha$  par les pDC, conduisant à la production d'auto-anticorps antinucléaires et à des manifestations cliniques proches du LES humain. (Figure 26)

De manière intéressante, Villanueva et *al.* ont décrit une sous-population de PN de faible densité (low-density granulocytes, LDGs) chez les patients lupiques. Ces cellules pourraient exposer de fortes concentrations de matériel antigénique, comme l'ADN double brin et le peptide LL-37, ainsi que des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-17 (Villanueva et al., 2011). Aussi, les modifications post-traductionnelles des histones (oxydation, méthylation, citrullination) sont évoquées comme inductrices de la formation d'auto-anticorps au cours du lupus (Liu et al., 2012a; Neeli et al., 2008).

La capacité de dégradation des NETs est diminuée chez les patients lupiques. Leur demi-vie peut être augmentée par divers facteurs : 1) la protection de l'ADN contre l'action de nucléases par certaines protéines des NETs ; 2) l'inhibition directe de la DNase-1 circulante par le C1q déposé sur les NETs (Leffler et al., 2012) ; 3) un déficit génétique en DNase (Hakkim et al., 2010). Récemment, dans une étude prospective, ce défaut dans la dégradation des NETs a été associé à certains paramètres cliniques des patients comme le développement d'une glomérulonéphrite ou la présence d'anticorps anti-ADN et anti-histones (Leffler et al., 2013). L'amélioration des scores cliniques après traitement est associée à une meilleure capacité à dégrader les NETs ;

ceci pointe l'importance du développement d'essais thérapeutiques visant à renforcer la destruction des NETs.

Enfin, étant donnée la présence de PN infiltrant le rein au cours de la néphrite lupique, complication la plus sévère du LES, le rôle cytotoxique des NETs a été évoqué récemment et fait l'objet de travaux en cours dans notre équipe (collaboration avec le Pr E Daugas).

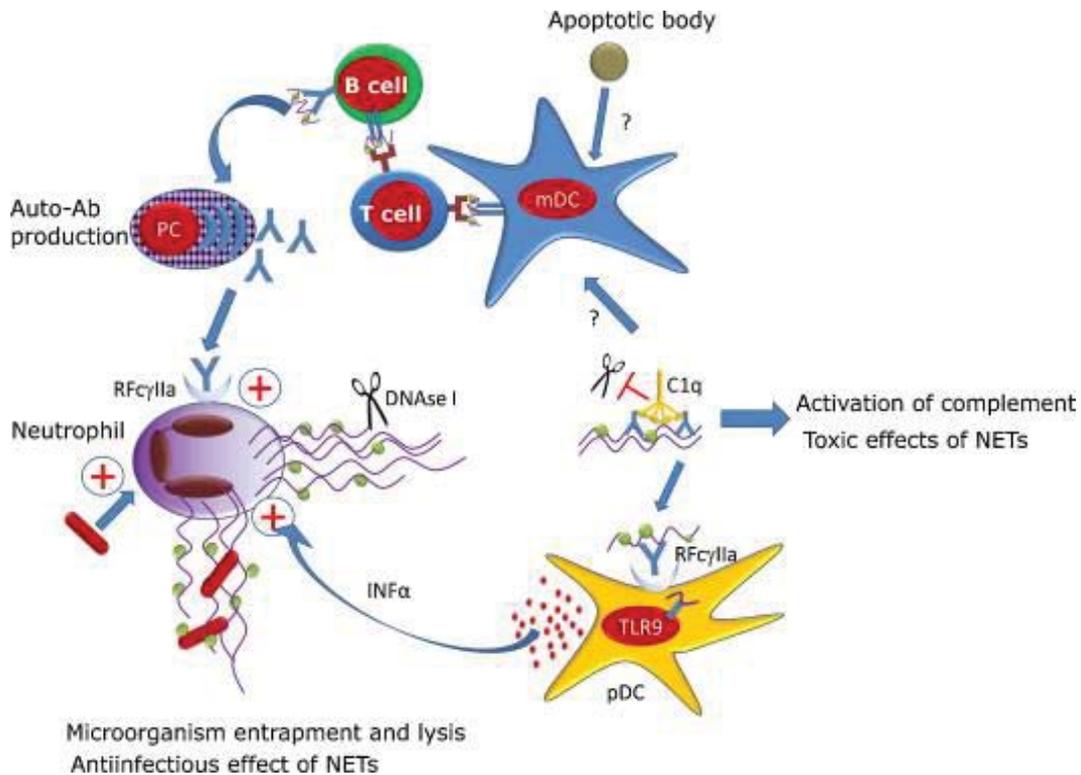


Figure 26. Aperçu des principales données et hypothèses sur le rôle des NETs dans la physiopathologie du LES. D'après de Chaisemartin et al. Joint Bone Spine 2013

### 2.7.6.5. Le psoriasis

Le psoriasis est une maladie inflammatoire cutanée fréquente pouvant être associée à des atteintes articulaires sévères et où l'IL-17 semble jouer un rôle. L'afflux important de mastocytes et de PN dans les lésions du psoriasis contribuent à la libération de cette cytokine exprimée sur les NETs ; de plus l'IL-23 et IL-1 $\beta$  agissent comme *stimuli* de ce phénomène confirmant l'importance de l'axe IL-23/IL-17 dans cette maladie (Lin et al., 2011). Une autre étude a montré la co-localisation des PN et des pDC dans la peau de patients psoriasiques ; les NETs stimulent les pDC qui vont produire de l'IFN de type I. Dans ce travail, les auteurs ont aussi identifié le SLPI

comme composant des NETs impliqué dans ce mécanisme. L'IFN $\alpha$  produit pourrait augmenter la réponse pro-inflammatoire mais aussi contribuer à la réparation de la peau endommagée grâce à cet inhibiteur de protéase (Skrzeczynska-Moncznik et al., 2012).

#### ***2.7.6.4. La polyarthrite rhumatoïde***

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie à composante auto-immune, inflammatoire chronique systémique, dont la cible majeure est l'articulation. La formation d'auto-anticorps contre les Ag protéiques citrullinés (ACPA) est considérée comme un événement-clé dans la pathogénèse (Deane et al., 2010). Il semble licite d'émettre l'hypothèse selon laquelle les différentes protéines citrullinées à la surface des NETs pourraient constituer des néo-Ag à l'origine de la production d'autoanticorps spécifiques. En effet, certaines protéines cibles de la PR, comme la vimentine et l' $\alpha$ -énolase sont présentes sur les NETs (Khandpur et al., 2013). De plus, il a été récemment publié que le sérum des patient PR reconnaissait l'H4 et l'H4 citrulliné présents sur les NETs, proposant cette protéine comme une nouvelle cible auto-immune de la PR. (Pratesi et al., 2013).

Un infiltrat de PN, dont certains expriment des NETs est observé dans le tissu synovial, les nodules rhumatoïdes et la peau de patients atteints de PR. L'observation de la NETose est corrélée à la présence d'ACPA et à l'intensité de la réponse inflammatoire systémique (CRP, vitesse de sédimentation, IL-17). Les PN circulants et issus du liquide synovial de ces patients produisent davantage de NETs *ex vivo* que les PN de donneurs sains. Par ailleurs, le sérum de ces patients riche en ACPA et/ou facteur rhumatoïde induit la libération de NETs de composition particulière ; selon les conditions de stimulation, la composition protéique des NETs varie entre 28 et 40 composants. Ces NETs ont la capacité d'induire la production d'IL-6, d'IL-8, et de chimiokines dans les fibroblastes synoviaux de patients ayant une PR ou une arthrose. (Khandpur et al., 2013).

Dans le cas du syndrome de Felty, forme d'arthrite accompagnée de neutropénie, les auto-anticorps présents dans le sérum de ces patients se lient aux NETs, en particulier aux histones citrullinés (Dwivedi et al., 2012).

Notre équipe mène actuellement des travaux visant à mieux connaître les composants des NETs impliqués dans la réponse auto-immune au cours de la PR, ainsi que le rôle de la PAD4 (collaboration Pr P. Dieudé et Dr P. Poncet)..

## 2.8. NETs comme cible thérapeutique

L'implication des NETs dans plusieurs maladies inflammatoires aiguës et chroniques, et leurs effets parfois délétères font d'eux une cible thérapeutique.

Des études *in vivo* chez la souris ont décrit les effets bénéfiques de la rhDNase. Sangaletti et *al.* ont montré que l'inhibition de la production des NETs par la DNase empêchait l'internalisation de la PR3 et de la MPO par les mDC et prévenait la vascularite auto-immune (Sangaletti et al., 2012). Le traitement avec de la DNase est déjà utilisé au cours de la mucoviscidose pour réduire la viscosité bronchique, en dépolymérisant l'ADN accumulé dans les poumons (Huggins et al., 2011). Cependant, Dubois et al. ont montré que le traitement de la mucoviscidose avec de la DNase pourrait augmenter l'activité de l'ELA (Dubois et al., 2012). De la même façon, l'administration de rhDNase chez les souris au cours du sepsis induit une progression de l'infection et la mortalité (Meng et al., 2012).

Les dommages tissulaires produits en présence de NETs sont dus en particulier, aux protéines qui sont y associées comme les protéases et les histones, qui représentent donc des cibles thérapeutiques. L'utilisation d'inhibiteurs d'ELA ou de MPO peuvent abolir la formation de NETs (Kirchner et al., 2012; Papayannopoulos et al., 2010). Par contre, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases exogènes est inefficace chez les patients atteints de mucoviscidose ; il est suggéré que les NETs sont des réservoirs pour ces protéases actives et les protégeraient de l'action des inhibiteurs (Dubois et al., 2012).

L'utilisation d'anticorps anti-histones a aussi été proposée dans le modèle murin de TRALI afin de rechercher un effet protecteur contre les lésions pulmonaires (Caudrillier et al., 2012). Mais l'utilisation d'anticorps anti-histones soulève quelques inquiétudes ; elle pourrait favoriser le développement de maladies auto-immunes car les histones extracellulaires sont très immunogènes (Liu et al., 2012a). Une alternative pour neutraliser les histones pourrait être l'utilisation de polymères anioniques tels que l'acide sialique (Saffarzadeh et al., 2012).

De nouveaux traitements pourraient être conçus sur la base de molécules efficaces *in vitro*. Par exemple, les inhibiteurs de la PAD4, tels que la Cl-amidine (Willis et al., 2011), pourraient avoir des effets bénéfiques. De même, la colchicine ou d'autres molécules qui déstabilisent le cytosquelette réduiraient la capacité des PN à expulser les NETs (Neeli et al., 2009). La dexaméthasone n'a pas d'effet dans la production des NETs ; par contre l'acide acétylsalicylique (ASA) empêche leur formation (Lapponi et al., 2013). Deux molécules inhibitrices de NFκB (BAY 11-7082 et Ro 106-9920), sont aussi capables d'inhiber *in vitro* la formation des NETs (Lapponi et al., 2013).

Il existe des régulateurs physiologiques des NETs, comme la SerpinB1 ou les protéines du surfactant (SP). La SerpinB1 est une protéine cytoplasmique du PN, inhibiteur des sérines protéases. Sa translocation au noyau va réguler négativement la NADPH-oxydase, la production de FRO, limiter la décondensation de la chromatine et ainsi inhiber la NETose (Farley et al., 2012). Les SP peuvent opsoniser les pathogènes et les cellules apoptotiques ou nécrotiques, avant phagocytose par les macrophages alvéolaires ; des études préliminaires indiquent que SP-D peut augmenter la clairance des NET par les macrophages alvéolaires (Douda et al., 2011a). Des thérapeutiques visant leur induction permettraient de moduler la production ou l'élimination des NETs.

Sachant que, la production des NETs comprend des éléments communs à d'autres voies d'activation essentielles pour le fonctionnement de l'organisme (par exemple les voies ERK, p38 MAPkinase, l'autophagie, la production de FRO...) il faudrait donc réfléchir à la conception de médicaments régulant spécifiquement la NETose. D'autre part, même si un excès de NETs semble avoir des conséquences délétères pour l'organisme, ils ont un rôle physiologique important dans la protection de l'hôte contre les infections et probablement d'autres fonctions encore méconnues.

La production des NETs impliquant de nombreux mécanismes d'activation cellulaire, la conception de thérapeutiques ciblées et spécifiques est difficile. De plus, l'inhibition de la NETose pourrait avoir des conséquences infectieuses sévères pour l'hôte.

### **2.9. Les mystères non dévoilés de la NETose**

Le processus de NETose n'est connu des scientifiques que depuis 2004. Après les premières descriptions des mécanismes *in vitro*, des observations *in vivo*, essentiellement chez l'homme, ont permis de mettre en avant cette nouvelle capacité

fonctionnelle des PN. Outre leur participation à la réponse anti-infectieuse bien établie, les NETs sont impliqués dans la physiopathologie d'un nombre croissant de maladies, comme les maladies auto-immunes, l'athérosclérose, les inflammations aiguës ou le cancer.

Cependant, de nombreuses questions restent ouvertes, en particulier sur les mécanismes de la NETose, et font l'objet de beaucoup de travaux en cours ; elles sont résumées ci-dessous :

- L'importance de l'explosion oxydative est peu discutable, mais les modes de production de NETs non-dépendants des FRO doivent être mieux compris.
- La décision pour laquelle un PN va s'engager vers un processus de NETose ou pas est inconnue. *In vitro*, un faible pourcentage est toujours observé, dépendant du *stimulus*, de la cinétique d'activation, de l'existence d'un amorçage ou de l'état de maturation du PN.
- La balance entre effet bénéfique et effet délétère des NETs doit être mieux appréhendée, dans chaque situation clinique incriminée. Ceci permettrait de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques spécifiques visant à activer ou réguler la production de NETs *in vivo*.
- La composition protéique des NETs et leur structure peuvent varier selon le *stimulus* utilisé. Il sera intéressant d'évaluer ces caractéristiques et les mettre en relation avec le développement ou non de certaines maladies : existe-t'il des NETs « normaux » et des NETs « pathologiques » ?
- La production de NETs est un outil que possèdent les cellules de l'immunité innée pour lutter contre les agents infectieux, mais ce processus n'est pas silencieux vis-à-vis de la réponse immunitaire de manière plus générale, et d'autres fonctions des NETs doivent être explorées.



*Chapitre 3 :*  
*Les cellules dendritiques*



En 1868, Paul Langherans a été le premier à identifier des cellules dendritiques (DC) au niveau de l'épiderme. Toutefois, elles ont été assimilées à des terminaisons nerveuses. En 1973, presque un siècle après cette découverte, Ralph Steinman et Zanvil Cohn ont isolé, à partir de rate de souris, des cellules ayant une morphologie semblable. À cause de leur forme étoilée particulières, elles ont été nommées «cellules dendritiques». Par la suite, les DC ont été retrouvées dans le sang, la lymphe, les organes lymphoïdes et dans tous les tissus et organes non lymphoïdes du corps. (Sato and Fujita, 2007).

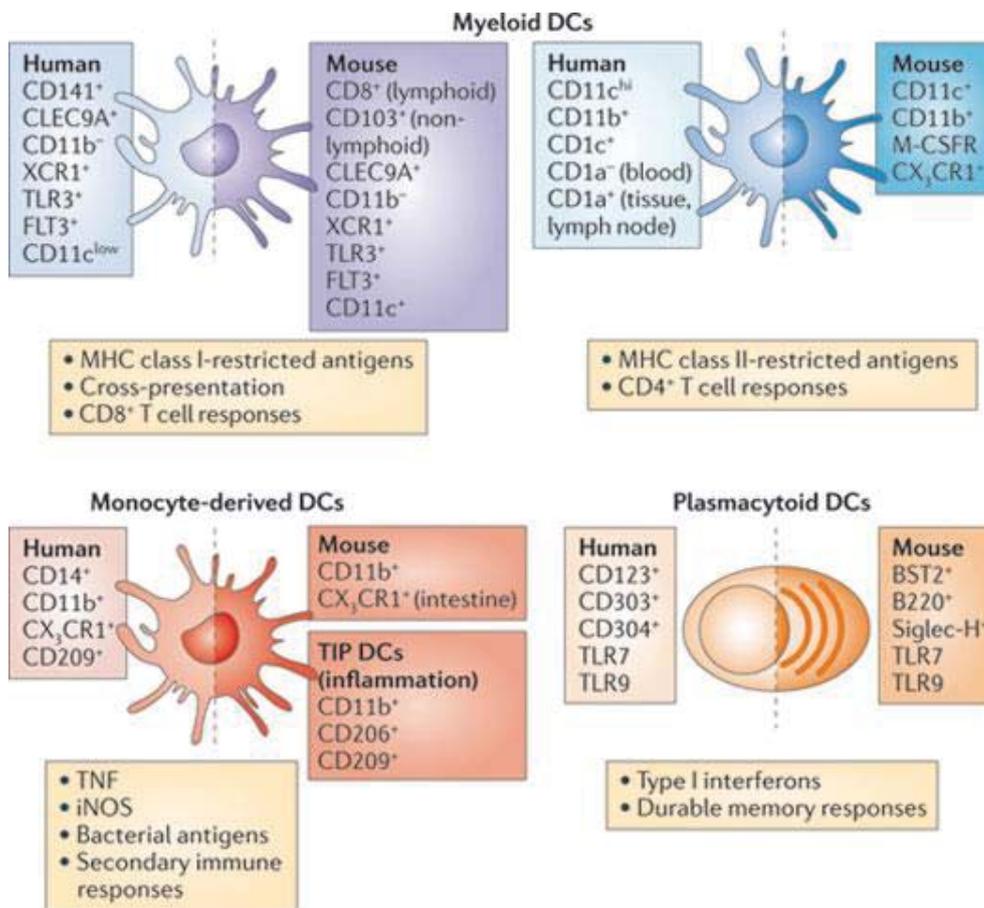
Les DC sont des cellules sentinelles du système immunitaire, dont le principal objectif est de surveiller les tissus et instruire le système immunitaire adaptatif en réponse à des signaux périphériques (Banchereau et al., 2000). Les DC sont considérées comme les CPA, par excellence. Elles ont la capacité de phagocyter/endocyter des composants antigéniques, de les apprêter pour les exposer à leur surface et ainsi, grâce aux molécules de co-stimulation et aux cytokines, initier la réponse des LyT spécifiques.

### 3.1. Classification des cellules dendritiques

Chez l'homme et chez la souris, les DC comprennent plusieurs sous-populations identifiables en fonction de l'expression de marqueurs de surface (Figure 27), leur analyse fonctionnelle comparative et le profil génétique a permis d'établir des homologues entre les deux espèces (Collin et al., 2011).

Classiquement, les DC humaines en circulation sont classées en trois populations : les DC plasmacytoïdes (pDC) et deux types de DC myéloïdes (mDC), l'une CD1c<sup>+</sup> et l'autre CD141<sup>+</sup> (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Cependant de nouveaux marqueurs ont permis de décrire d'autres DC présents dans différents tissus lymphoïdes (Segura et al., 2012) et non lymphoïdes (Klechevsky et al., 2008) ainsi que des DC différenciées à partir de monocytes au site inflammatoire (Segura and Amigorena, 2013b); de ce fait, la classification est en permanence remaniée.

Dans ce chapitre, la classification des sous-populations de DC révisée par Collin et al. a été reprise. Elle divise les DC en 4 populations selon leur phénotype (Collin et al., 2013).



**Figure 27. Principaux marqueurs de surface des populations de DC chez l'homme et leurs homologues chez la souris.** Les DC myéloïdes humaines et les DC conventionnelles chez la souris sont divisées en deux populations : les CD141<sup>+</sup> et les CD1c<sup>+</sup> chez l'homme et les CD8<sup>+</sup> et CD11c<sup>+</sup> chez la souris ; les DC plasmacytoïdes sont facilement reconnaissables par leur capacité à produire de l'INF de type I, et les DC dérivées des monocytes sont la sous-lignée récemment reconnue DC CD11b<sup>+</sup> chez la souris qui peut être homologue aux DC CD14<sup>+</sup> chez l'homme. D'après Collin et al, Nat Rev Immunol 2011.

### 3.1.2. Les cellules dendritiques myéloïdes

Les mDC expriment des Ag typiques myéloïdes : CD11b, CD11c, CD13 et CD33 ; elles correspondent aux DC conventionnelles CD11c<sup>+</sup> chez la souris. Chez l'homme, les mDC se différencient des monocytes car elles n'expriment pas le CD14 ou le CD16. Deux sous-populations de mDC sont proposées selon leur expression de CD1c<sup>+</sup> et de CD141<sup>+</sup>. Ces deux fractions partagent une homologie avec les DC chez la souris qui expriment de leur côté le CD11b (mDC CD1c<sup>+</sup>) ou le CD8/CD103 (mDC CD141<sup>+</sup>).

### 3.1.2.1 mDC-CD1c<sup>+</sup>

Les mDC-CD1c<sup>+</sup> sont la population majoritaire de mDC chez l'homme, aussi bien dans le sang (environ 1% des cellules mononucléées) que dans les tissus et les organes lymphoïdes. Elles ont été initialement reconnues dans le sang comme une fraction cellulaire HLA-DR<sup>+</sup> lin<sup>-</sup>, exprimant des Ag myéloïdes CD11b, CD11c, CD13, CD33, CD172 (SIRPa) et CD45RO. Le CD1c a été identifié grâce à l'anticorps commercial BDCA-1 (Palucka and Banchereau, 2013).

Dans les tissus, les mDC-CD1c<sup>+</sup> cutanées ont été caractérisées comme des DC-CD1a<sup>+</sup> en migration (Schulz et al., 2009; Svensson et al., 2008). Elles se différencient des cellules de Langerhans (LC) grâce à la langerine, l'EpCAM et à l'expression forte du CD1a. Les DC-CD1c<sup>+</sup> tissulaires humaines ont un phénotype activé. Elles ont perdu l'expression du CD62L et du récepteur de domiciliation CLA, mais elles expriment le CCR7 (Monteleone et al., 2008). Dans les ganglions lymphatiques, les DC-CD1c<sup>+</sup> font partie des cellules interdigitées des zones T. (Angel et al., 2006).

Les DC-CD1c<sup>+</sup> sont équipées d'un large panel de récepteurs de type lectine, de TLR et de PRR, pour la reconnaissance des Ag, leur transport et leur exposition en surface. Elles sont de bons stimulants de LyT CD4<sup>+</sup> naïfs et sécrètent du TNFα, de l'IL-8, de l'IL-10, de l'IL-12 et de l'IL-23. (Segura et al., 2012; van de Ven et al., 2011)

### 3.1.2.2. mDC-CD141<sup>high</sup>

L'expression de CD141<sup>high</sup> ou thrombomoduline, marqué avec l'anticorps BDCA-3, est observée sur environ 10% des mDC circulantes humaines du sang et par une fraction des DC tissulaires. Les DC CD8<sup>+</sup> dans les ganglions lymphoïdes et les DC CD103<sup>+</sup> dans les tissus sont les homologues des DC-CD141<sup>high</sup> chez la souris. (Villadangos and Shortman, 2010)

Les DC-CD141<sup>high</sup> sont difficiles à identifier *in situ* en raison de leur petit nombre et de l'expression du CD141<sup>high</sup> dans d'autres cellules. En particulier, CD141<sup>high</sup> se trouve sur les DC CD14<sup>+</sup> migratoires et dans les DC CD1c<sup>+</sup> et les monocytes mis en culture avec de la vitamine D. La différenciation majeure entre les DC-CD1c et les DC-CD141<sup>high</sup> est observée par cytométrie en flux, l'expression de CD11b et CD11c étant diminuée dans les secondes. (Haniffa et al., 2013)

Les DC-CD141<sup>high</sup> ont la capacité de reconnaître les cellules mortes ou nécrotiques *via* CLEC9A, les acides nucléiques viraux *via* TLR-3 et TLR-8 et *via* la présentation croisée de l'Ag aux LyT CD8<sup>+</sup> (Jongbloed et al., 2010). Les DC-CD141<sup>high</sup> sécrètent de l'IFN- $\beta$ , CXCL10 et l'IL-12p70.

### **3.1.3. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes**

Les pDC ont été découvertes en 1958 par Lennert et Remmele, dans les zones T des tissus lymphoïdes. À cette époque, elles étaient considérées comme des cellules plasmacytoïdes à cause de leur ressemblance aux plasmocytes, plus tard comme des cellules T plasmacytoïdes. Après la découverte de marqueurs de la lignée myélo-monocytaire, ces cellules ont été appelées « monocytes plasmacytoïdes » ; mais c'est en 1999 qu'elles ont été définitivement identifiées dans le sang et dans les organes lymphoïdes secondaires. (Reizis et al., 2011)

Les pDC humaines se différencient des mDC par les marqueurs CD303 (CLEC4C; BDCA-2), ILT7 (immunoglobulin-like transcript 7), CD123 (IL-3R), et CD304 (neuropilin; BDCA-4); elles expriment aussi le CD45RA, de façon variable, le CD2 et le CD7 (Reizis et al., 2011). Elles ne sont pas abondantes dans les tissus au repos mais elles sont rapidement recrutées au site inflammatoire. Dans les ganglions lymphoïdes elles représentent environ 20% de cellules CMH-II. Contrairement aux mDC, les pDC possèdent une faible capacité d'endocytose de l'Ag ainsi qu'une faible expression des cathepsines S et D (molécules lysosomales impliquées dans le processus de génération des peptides antigéniques). (Tel et al., 2012)

Après maturation par des ADN et ARN viraux, les pDC sécrètent une forte quantité d'IFN de type I. Ce dernier va permettre d'activer la fonction cytolytique des cellules NK et favoriser la différenciation, la maturation et les fonctions allo-stimulatrices des mDC. Par ailleurs, les pDC contrôlent aussi la différenciation des LyB en plasmocytes sécrétant principalement des IgG. Enfin, elles sont capables d'induire une réponse des LyT vers Th1 ou Th2 selon l'environnement et sembleraient générer des LyT régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, grâce à leur capacité à détecter l'ADN libéré par les cellules apoptotique et l'expression notable de ILT7. (Reizis et al., 2011; Tel et al., 2012)

#### 3.1.4. Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans (LC) sont présentes dans l'épiderme et les muqueuses (bronchiales, orales et génitales), où elles forment un réseau. Elles expriment des molécules exprimées par d'autres classes de DC comme le CD1a, ce qui leur permet de présenter des Ag d'origine lipidique. Toutefois, elles expriment aussi des molécules spécifiques telles que la langerine, une lectine de type C qui jouerait un rôle dans la présentation des Ag glycopeptidiques, et la E-cadhérine, une molécule d'adhérence permettant leur rétention dans l'épiderme. De même, elles possèdent des organelles intracellulaires, les granules de Birbeck. Il s'agit d'endosomes lamellaires qui participeraient au processus de chargement de l'Ag. Les autres marqueurs exprimés par ces cellules sont le CD36, l'ATPase et le FcεR1. (Ginhoux and Merad, 2010)

Après capture de l'Ag, les LC, comme les DC, migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour présenter les Ag aux LyT. Pourtant, il existe une controverse au sujet du rôle physiologique des LC en ce qui concerne leurs capacités immuno-régulatrices et/ou immuno-stimulatrices (Stoitzner, 2010). Pour certains, les LC humaines sont les plus puissantes pour induire la polarisation *in vitro* de LyT CD4<sup>+</sup> naïfs en LyT de phénotype effecteur Th2, Th17 ou Th22 (Fujita et al., 2009; Furio et al., 2010; Mathers et al., 2009). D'autres auteurs, grâce à des études *in vitro* et l'utilisation de souris déficientes en LC, ont montré que les LC pourraient effectivement atténuer l'inflammation et médier la tolérance, en particulier dans les réactions d'hypersensibilité de contact (Kaplan, 2010; Lutz et al., 2010; Seneschal et al., 2012).

Bien que la fonction précise des LC dans la réponse immunitaire ne soit pas totalement comprise, il semble que les LC puissent exercer des fonctions multiples selon les signaux environnants dans la peau.

#### 3.1.5. Les cellules dendritiques CD14

Les DC-CD14 se trouvent dans les tissus et les ganglions lymphatiques et elles pourraient dériver directement des monocytes. Des cellules similaires existent chez la souris, les DC CD11b classiques qui expriment CD64. (Haniffa et al., 2009)

Les DC-CD14 cutanées expriment DC-SIGN (CD209), LOX-1, CLEC-6, la dectin-1 et DCIR. Les DC-CD14 récupérées à partir d'explants de peau humaine sont moins matures et plus proches des macrophages que les DC-CD1c ; de plus elles ne peuvent

pas stimuler efficacement les cellules T naïves. Les DC-CD14 cutanées produisent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ , mais pas d'IL-15, ce qui empêche l'induction d'effecteurs LyT CD8<sup>+</sup>. *In vitro*, les DC-CD14 conservent leur capacité à se différencier en cellules LC-like ou DC-like matures, et au repos, elles ont des fonctions tolérogènes qui peuvent être reproduites par traitement des monocytes avec de la vitamine D. (Collin et al., 2013; Klechevsky and Banchereau, 2013)

Comme les DC-CD14 expriment peu de CCR7, leur migration vers les ganglions lymphatiques est discutée (Haniffa et al., 2009); il est possible que les DC-CD14<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> qui se trouvent dans le paracortex des ganglions dérivent directement du sang (Haniffa et al., 2012). Les DC-CD14 ont des fonctions importantes pendant la formation des LyT auxiliaires folliculaires (Reizis et al., 2011) et apportent aussi de l'aide directe aux LyB (Dzionek et al., 2000).

### 3.2. Les cellules dendritiques différenciées à partir des monocytes

#### 3.2.1. Les DC inflammatoires

L'infiltration cellulaire des tissus et des organes lymphoïdes est considérablement modifiée au cours de l'inflammation. Il y a principalement un recrutement de granulocytes, monocytes et pDC. Les DC résidentes deviennent plus difficiles à détecter, soit parce qu'elles vont migrer ou parce que leur proportion relative diminue considérablement. En revanche, une nouvelle population de DC non présentes en condition d'homéostasie est détectable : les DC inflammatoires. Les monocytes CD14<sup>+</sup> sont les précurseurs probables de ces DC mais un apport par les DC du sang est possible, suggéré par l'expression de CD62L et CXCR3. Les DC inflammatoires expriment le CD1c, le CD1a, le CD206, le Fc $\epsilon$ R1 et le Sirpa mais pas le CD16 ni le CD209. *In vitro*, elles synthétisent l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-23, et elles stimulent la réponse Th17. (Segura and Amigorena, 2013a)

Ce sous-type de DC comprend en particulier des DC inflammatoires épidermiques (IDEC), observées dans la dermatite atopique Th2-dépendante et des DC productrices de TNF et du iNOS, DC-TIP, trouvées dans le psoriasis (Hessel and Moser, 2012).

Ces données suggèrent que les différents environnements inflammatoires vont générer des sous-populations de DC dérivées de monocytes avec des fonctions distinctes. De nombreuses questions restent à élucider, notamment sur leur origine

sanguine, sur leur migration vers les ganglions ou sur leur capacité à devenir des cellules résidentes après la résolution de l'inflammation.

### **3.2.2. Les SLAN-DC**

La population de monocytes humains est hétérogène (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). En particulier, les monocytes CD16<sup>+</sup> possèdent des caractéristiques qui ont conduit certains auteurs à les classer comme un type de DC (Gunther et al., 2012), en raison de leur expression importante de molécules du CMH-II et de molécules de co-stimulation. En particulier, une sous-population de monocytes CD16<sup>+</sup> caractérisée par l'expression de l'Ag 6-sulfo LacNAc (SLAN-DC) est connue pour la sécrétion rapide de grandes quantités de TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-12. (Hansel et al., 2011; Schakel et al., 2002). Les SLAN-DC sont impliquées dans certaines maladies comme le LES, le psoriasis ou les processus tumoraux (Gunther et al., 2012; Hansel et al., 2013; Hansel et al., 2011; Jahnisch et al., 2013)

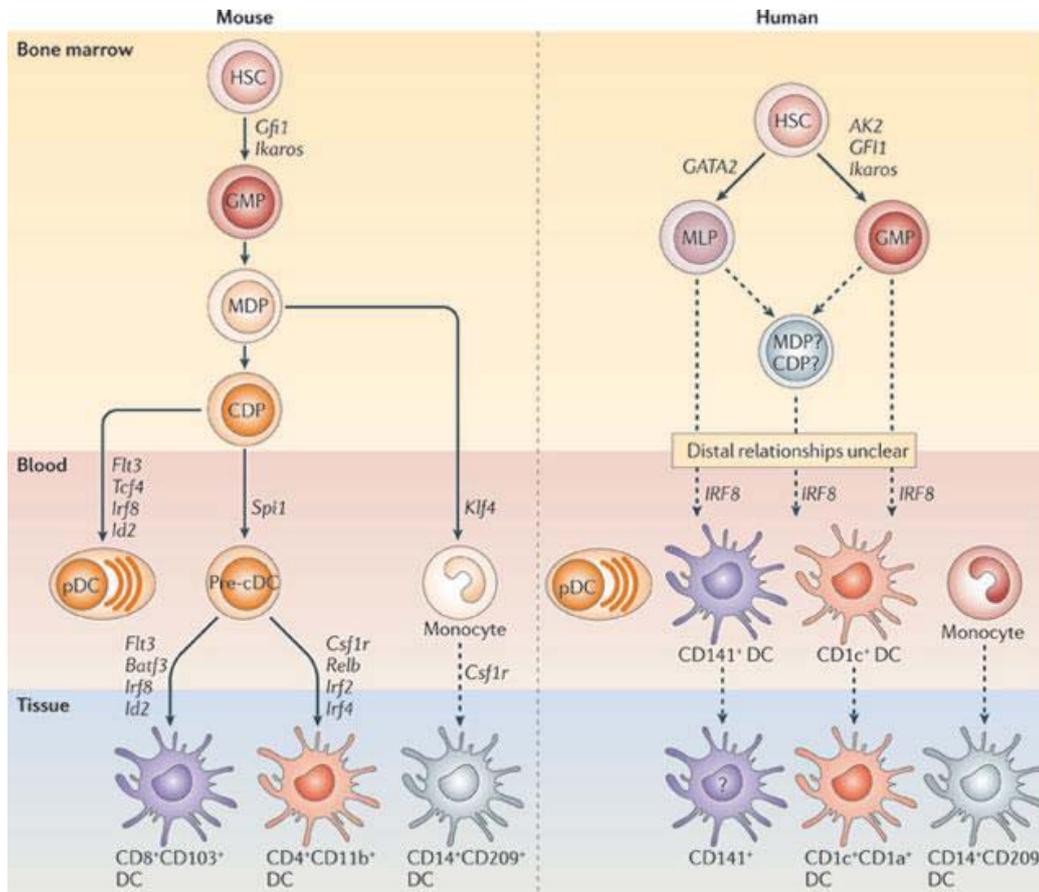
### **3.3. Ontogénie des cellules dendritiques**

Contrairement aux autres cellules de la lignée hématopoïétique, les DC présentent une grande flexibilité dans les possibles voies de génération. Des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension de la régulation du développement des DC dans le modèle murin. Durant la dernière décennie, diverses équipes ont identifié une population qui génère spécifiquement des DC. Plusieurs cytokines et facteurs de transcription qui contrôlent le développement et la diversification ont également été découverts chez la souris (Merad et al., 2013). La Figure 28, résume le développement des DC aussi que les cytokines et facteurs de transcription impliqués dans les modèles murin et humain.

Des études de transfert adoptif ont suggéré que le développement des DC peut provenir des progéniteurs-restreints soit lymphoïdes soit myéloïdes. Bien que la contribution précise de ces progéniteurs soit encore en discussion, une étude a proposé qu'environ 10% des DC présentes dans les organes lymphoïdes proviennent de progéniteurs lymphoïdes communs, ce qui suggère que les 90% restants dérivent de progéniteurs myéloïdes communs (Schlenner et al., 2010). Chez la souris, parmi ces précurseurs myéloïdes, on trouve le progéniteur commun spécifique des macrophages et des DC (MDP) qui peut générer des pDC, des mDC, des monocytes et des

macrophages (Doulatov et al., 2010). En parallèle, un précurseur commun des DC (CDP) a été identifié à l'origine des mDC et des pDC (Naik et al., 2007). Au niveau clonal, les CDP sont capables de générer toutes les sous-populations de DC et semblent représenter le précurseur immédiat de pré-DC (Liu et al., 2009). Les pré-DC circulantes rejoignent les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes et terminent leur différenciation en DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> ou CD11b<sup>+</sup>. En revanche, les pDC terminent leur différenciation dans la moelle osseuse puis migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. Dans le cas de l'ontogénie des DC humaines, les DC monocytoïdes peuvent être générées à partir de deux précurseurs : les GMP et les MLP, dans le compartiment hématopoïétique de la moelle osseuse (Doulatov et al., 2010). L'origine médullaire des DC tissulaires humaines a été formellement prouvée par la transplantation de cellules souches hématopoïétiques, qui s'accompagne d'un renouvellement des LC de l'hôte par des LC du donneur au bout de quelques mois. En parallèle, un processus d'auto-renouvellement local est aussi possible. (Collin et al., 2006; Haniffa et al., 2009; Kanitakis et al., 2011)

Les mécanismes moléculaires et la régulation génique de l'ontogénie des DC humaines ont été mieux compris après l'observation de patients déficitaires (Collin et al., 2011). Deux gènes importants pour le développement des DC ont été identifiés : GATA-2 et IRF8. Une mutation hétérozygote dans le premier gène induit un défaut spécifique dans le développement des cellules mononucléées, connu sous le nom de déficit DCML (pour *DC, monocyte, B and NK lymphoid deficiency*). Il est caractérisé par une susceptibilité accrue aux infections, une incidence élevée de tumeurs solides et le développement d'une protéinose alvéolaire pulmonaire. Ces patients n'ont pas de DC détectable en circulation et peu de monocytes ; cependant leur pool de LC est normal (Bigley et al., 2011). La mutation récessive K108E dans le deuxième gène, l'IRF8, est associée à l'absence des mDC, pDC et monocytes circulants ; une autre mutation (T80A) est associée à l'absence de DC-CD1c<sup>+</sup>. La mutation K108E se traduit par une susceptibilité aux infections et aux syndromes lympho-prolifératifs tandis que les porteurs homozygotes de la mutation T80A ont seulement une légère augmentation de l'incidence d'infections. Dans les deux cas, les mutations d'IRF8 s'accompagnent d'une incidence accrue aux infections par des mycobactéries.



**Figure 28. Régulation de l'ontogénie des DC murines et humaines.** HSC, cellule souche hématopoïétique; CMP, progéniteur myéloïde commun; CLP, progéniteur lymphoïde commun; MDP, progéniteur commun spécifique des macrophages et des DC; CDP, progéniteur commun des DC; GMP, progéniteur commun des granulocytes et macrophages ; MLP, progéniteur lymphoïde multipotent). D'après Collin et al. Nat Rev Immunol 2011.

### 3.4. Obtention des cellules dendritiques *in vitro*

Du fait de leur faible présence dans le sang ( $\approx 1$  à  $2\%$  des leucocytes), l'étude directe de DC isolées d'échantillons biologiques reste limitée. Des méthodologies permettant l'obtention d'une plus grande quantité de DC à partir de précurseurs issus de cellules souches  $CD34^+$  ou de monocytes ont été développées. Ces méthodologies reposent sur l'utilisation de différentes cytokines pour orienter la différenciation des précurseurs vers les DC.

#### 3.4.1. A partir de cellules souches $CD34^+$

Les cellules souches  $CD34^+$  isolées à partir de la moelle osseuse ou du cordon ombilical de nouveau-nés peuvent être engagées dans une différenciation vers des DC de phénotypes différents. Ainsi, en présence de GM-CSF et de  $TNF\alpha$ , ces cellules

CD34<sup>+</sup> se différencie en deux sous-populations de DC (Caux et al., 1992; Caux et al., 1997; Caux et al., 1996a). La première population ressemble aux cellules de Langerhans et est caractérisée par l'expression du CD1a, de l'E-cadhérine ainsi que par la présence des granules de Birbeck, alors que la seconde population ressemble aux DC interstitielles ou dermiques. La genèse des LC est favorisée par l'ajout de TGFβ aux précédentes cytokines ou par différenciation en présence d'IL-3 et de TNFα (Caux et al., 1996b; Strobl et al., 1996). Les mDC sont induites lorsque la différenciation se fait en présence de Flt3, de SCF (pour *stem cell factor*), d'IL-6 et d'IL-3 ou en remplaçant ces deux dernières cytokines par le GM-CSF et l'IL-4 (Ward et al., 2006). Les pDC peuvent aussi être produites en présence de Flt3 ou des cytokines comme l'IL3 (Blom et al., 2000; Encabo et al., 2004).

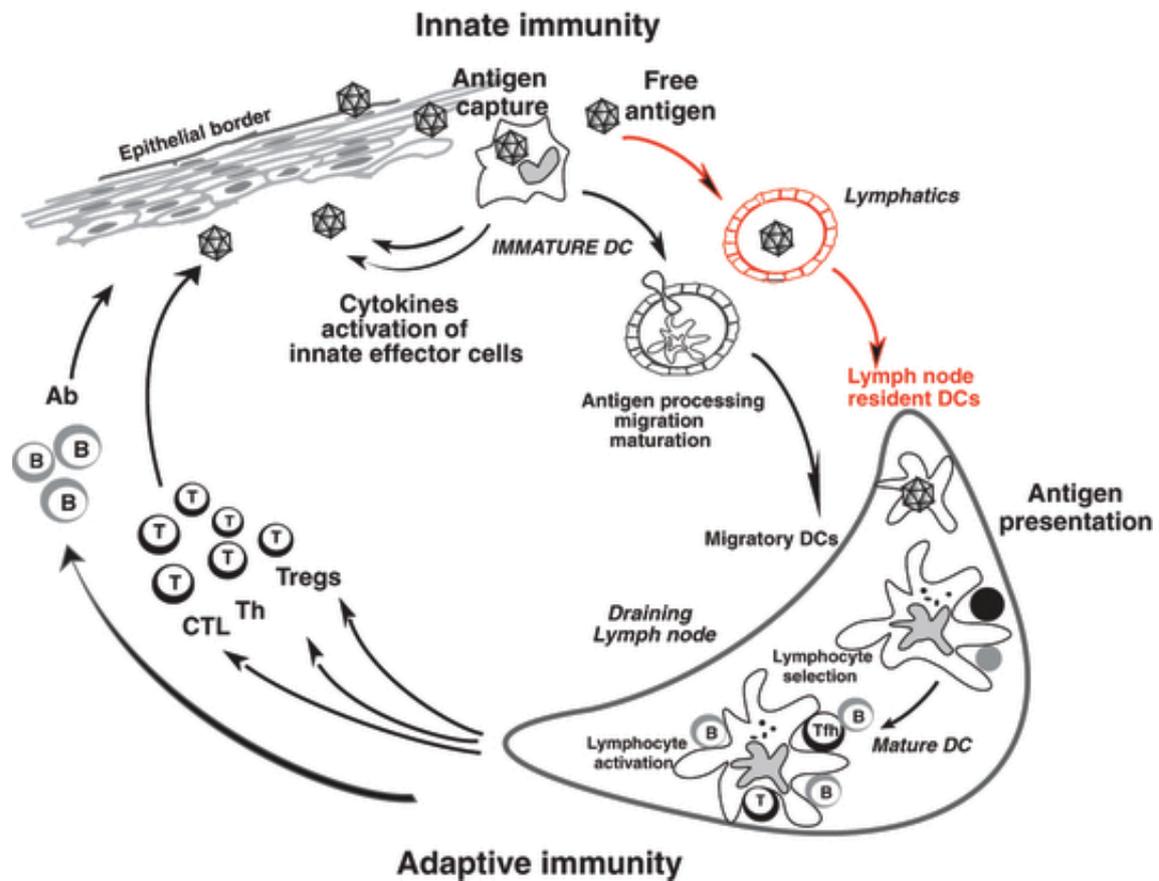
#### 3.4.2. A partir de monocytes

Chez l'homme, les monocytes sont les précurseurs les plus fréquemment utilisés pour l'obtention de DC *in vitro*. En présence de GM-CSF et d'IL-4, les monocytes se différencient en DC myéloïdes immatures (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). L'IL-4 peut être remplacée par l'IL-13 (Alters et al., 1999) et l'addition de TGFβ induit des cellules proches des LC (Geissmann et al., 1998).

Au bout de 5 à 7 jours, les monocytes ont perdu le marqueur CD14 et ont une morphologie et des fonctions de DC immatures, telles qu'une forte capacité de phagocytose, une faible expression des molécules du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation et la présence du récepteur CCR5, récepteur d'adressage des DC aux tissus périphériques. Le phénotype mature final, ou activé, est atteint en réponse à des *stimuli* tels que des agents infectieux ou des cytokines pro-inflammatoires. Cet état activé est caractérisé par l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation et du CMH-II et par l'expression de récepteurs aux chimiokines permettant l'adressage des DC vers les organes lymphoïdes secondaires (Antonios et al., 2010; Lee et al., 2002).

### 3.5. Rôle des cellules dendritiques

Les DC, cellules du système immunitaire inné, jouent un rôle fondamental dans l'activation des LyT naïfs. Cette fonction requiert préalablement la capture, l'apprêtement et la présentation des Ag ainsi que l'activation des DC (Figure 29).



**Figure 29. Représentation schématique de la fonction des DC.** Les DC immatures périphériques rencontrent l'Ag, deviennent matures et migrent vers les ganglions lymphatiques. Les DC présentent l'Ag aux LyT naïfs permettant ainsi le développement de la réponse immunitaire spécifique, humorale et cytotoxique. D'après Ueno et al, Immunol Rev 2010

### 3.5.1. Capture de l'Ag

Les DC immatures possèdent plusieurs mécanismes de capture des Ag solubles ou liés à des récepteurs tels que la macropinocytose, la micropinocytose, l'endocytose et la phagocytose. (Figure 30)

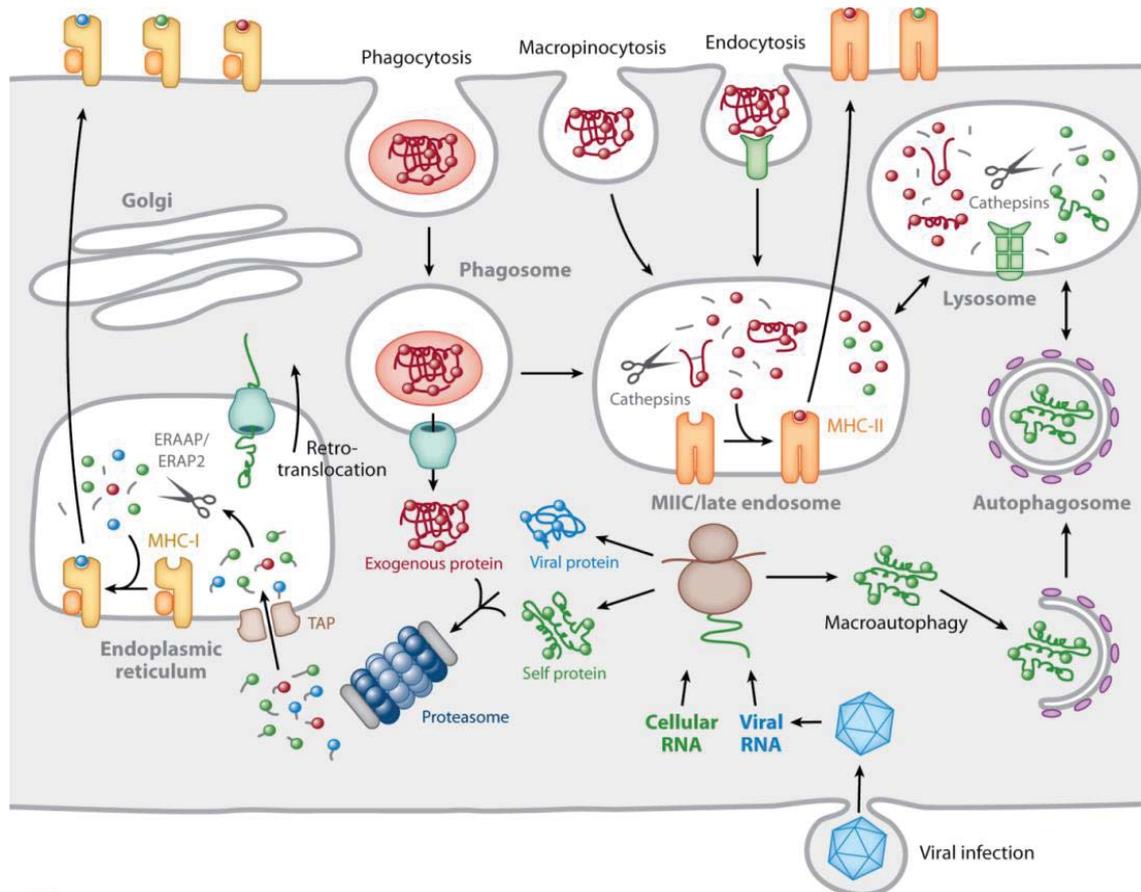
La **macropinocytose** est un mécanisme qui permet la filtration rapide du milieu extracellulaire afin de détecter la présence d'Ag solubles. Elle se déroule par invagination de la membrane plasmique formant de larges vacuoles intracellulaires de tailles variées (0,25 à 1  $\mu\text{m}$ ). Par ce mécanisme, une DC est capable d'ingérer la moitié de son volume cellulaire en une heure. (Doherty and McMahon, 2009)

La **micropinocytose**, comme la macropinocytose, désigne un mécanisme de filtration de l'environnement mais est caractérisée par la formation de petites vésicules

d'environ 80 nm. Ces vésicules sont créées après invagination de la membrane plasmique et sont souvent tapissées de clathrines (Doherty and McMahon, 2009).

L'**endocytose** implique l'intervention de récepteurs membranaires, et diffère de la phagocytose car cette dernière fait intervenir les filaments d'actine.

La **phagocytose** permet l'internalisation de particules, de microbes, de corps apoptotiques et d'autres fragments de cellules mortes par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. (Doherty and McMahon, 2009)



**Figure 30. Apprêtement des Ags et leur présentation via les molécules du CMH.** Les As sont internalisés par plusieurs voies (la phagocytose, la macropinocytose et l'endocytose en particulier). Puis ils sont transportés vers un compartiment endosomal mature ou tardif, où ils sont chargés sur des molécules du CMH-II. Les protéines cytosoliques sont dégradées principalement par l'action du protéasome, et les peptides générés sont pris en charge par le reticulum endoplasmique puis fixés sur les molécules CMH-I. Les DC sont les seules cellules à pouvoir introduire dans cette voie des protéines exogènes par retro-translocation de phagosomes, un phénomène connu sous le nom de présentation croisée. D'après Blum et al, Annu Rev Immunol 2013

Les récepteurs des DC intervenant dans le mécanisme d'endocytose et de phagocytose sont les FcγR (CD16, CD32, CD64), les récepteurs du complément, les

lectines de type C comme DEC-205 (CD205), le récepteur au mannose (CD206) ou DC-SIGN (CD209) ainsi que les récepteurs dits « scavenger » (Fonteneau et al., 2003). Ces récepteurs permettent à la DC la reconnaissance et l'endocytose des complexes immuns, d'Ag opsonisés, de glycoprotéines et de lipoprotéines modifiées. (Doherty and McMahon, 2009)

### 3.5.2. Apprêtement de l'Ag

La dégradation partielle des molécules antigéniques ainsi que leur voie de présentation sont des étapes importantes qui déterminent la spécificité et une partie de la qualité de la réponse immunitaire spécifique. Les DC sont capables de ré-exprimer à leur surface certains peptides issus de la protéolyse de ces Ag en association avec les molécules du CMH-I ou CMH-II (Figure 32).

#### 3.5.2.1. Voie d'apprêtement des Ag endogènes

Les Ag endogènes sont présentés par le CMH-I (Murphy et al., 2008). Ces molécules sont constituées d'une chaîne transmembranaire  $\alpha$  polymorphique associée de façon non covalente à une chaîne non polymorphique : la  $\beta$ 2-microglobuline. Les Ag endogènes cytosoliques ont pour principale origine les protéines du Soi (renouvellement des protéines intracellulaires normales ou tumorales) mais aussi des protéines virales ou des protéines issues des bactéries à développement intracellulaire. Ces peptides endogènes de 8 à 10 acides aminés sont obtenus après ubiquitination et dégradation partielle de ces protéines endogènes par le protéasome. Les peptides générés sont transportés du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique par le complexe TAP (pour *transporter associated with antigen processing*) et ils sont ensuite chargés sur les molécules du CMH-I (Hinz and Tampe, 2012). Ce processus implique de nombreuses protéines chaperonnes dont la tapasine, la calréticuline et la calnexine (Procko et al., 2005). Une fois le peptide fixé, le complexe CMH-I/peptide est transporté par l'intermédiaire de l'appareil de Golgi vers la surface cellulaire afin de permettre sa présentation aux LyT CD8<sup>+</sup> (Murphy et al., 2008).

#### 3.5.2.2. Voie d'apprêtement des Ag exogènes

Les Ag exogènes, provenant de l'extérieur de la cellule, sont internalisés dans des vésicules formant des endosomes. Ceux-ci fusionnent avec des lysosomes chargés

des protéases qui dégradent les Ag en peptides de 10 à 20 acides aminés. D'autre part, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du CMH-II sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique puis s'associent avec la chaîne invariante Ii ou CD74 (protéine chaperonne de 31-33 kDa) qui stabilise le complexe et bloque le sillon de présentation d'Ag (Gelin et al., 2009). Dans les DC, 50 à 80% des molécules du CMH-II sont dirigées vers la surface de la cellule avec Ii et sont rapidement internalisées dans les endosomes, pour être dégradées ou chargées avec un peptide. Dans les compartiments endosomaux, la chaîne Ii est dégradée et un seul fragment de cette chaîne, appelée CLIP (pour *Class II associated invariant chain peptide*) reste associé au CMH-II au niveau du sillon de présentation des peptides (Busch et al., 2005). Les molécules chaperonnes HLA-DM catalysent la libération de CLIP et, ainsi, des peptides antigéniques exogènes peuvent être chargés sur les molécules CMH-II (Schulze and Wucherpfennig, 2012). Le complexe CMH-II/peptide est alors transporté jusqu'à la membrane plasmique où il sera reconnu par les LyT CD4<sup>+</sup> spécifiques (Murphy et al., 2008).

Il est intéressant de remarquer que des molécules du CMH-II dépourvues de peptide antigénique sont présentes à la surface des DC immatures ; ces molécules peuvent jouer un rôle dans la capture et le traitement des Ag à la surface des cellules, aidées par les molécules chaperonnes HLA-DM (Schulze and Wucherpfennig, 2012).

### ***3.5.2.3. Présentation croisée***

Les DC ont la capacité de présenter des Ag exogènes par les molécules CMH-I, ce phénomène est appelé présentation croisée. La présentation croisée permet aux DC d'activer la réponse des LyT CD8<sup>+</sup> contre des virus, des parasites ou des tumeurs sans que la DC ne soit directement infectée ou transformée. Deux modèles ont été proposés pour décrire ce processus, la voie vacuolaire et la voie cytosolique (Segura and Villadangos, 2011). Dans la voie vacuolaire, les Ag internalisés et dégradés en peptides se lient directement aux molécules du CMH-I dans les endosomes et les phagosomes. Les molécules du CMH-I ayant accédé aux compartiments endosomaux par recyclage chargent ici des Ag exogènes. Dans la voie cytosolique, les Ag exogènes sont exportés des endosomes vers le cytoplasme où ils suivent la voie des Ag endogènes et sont chargés sur les molécules du CMH-I dans le RE voire dans des compartiments endosomaux. En effet, des protéines résidentes dans le RE, comme TAP et la machinerie de chargement des peptides sur des molécules CMH-I, peuvent être

recrutées dans les phagosomes et les endosomes (Amigorena and Savina, 2010). La présentation croisée est ainsi un moyen par lequel les DC peuvent présenter des peptides issus d'Ag exogènes par des molécules du CMH-I.

#### **3.5.2.4. Présentation des Ag lipidiques : les molécules CD1**

Les molécules de la famille CD1 présentent des Ag non classiques comme des lipides et glycolipides microbiens. Les lipides endogènes sont aussi pris en charge. Cette voie peut contribuer non seulement à l'immunité microbienne mais aussi à la réponse auto-immune et anti-tumorale (Gelin et al., 2009; Salio et al., 2010).

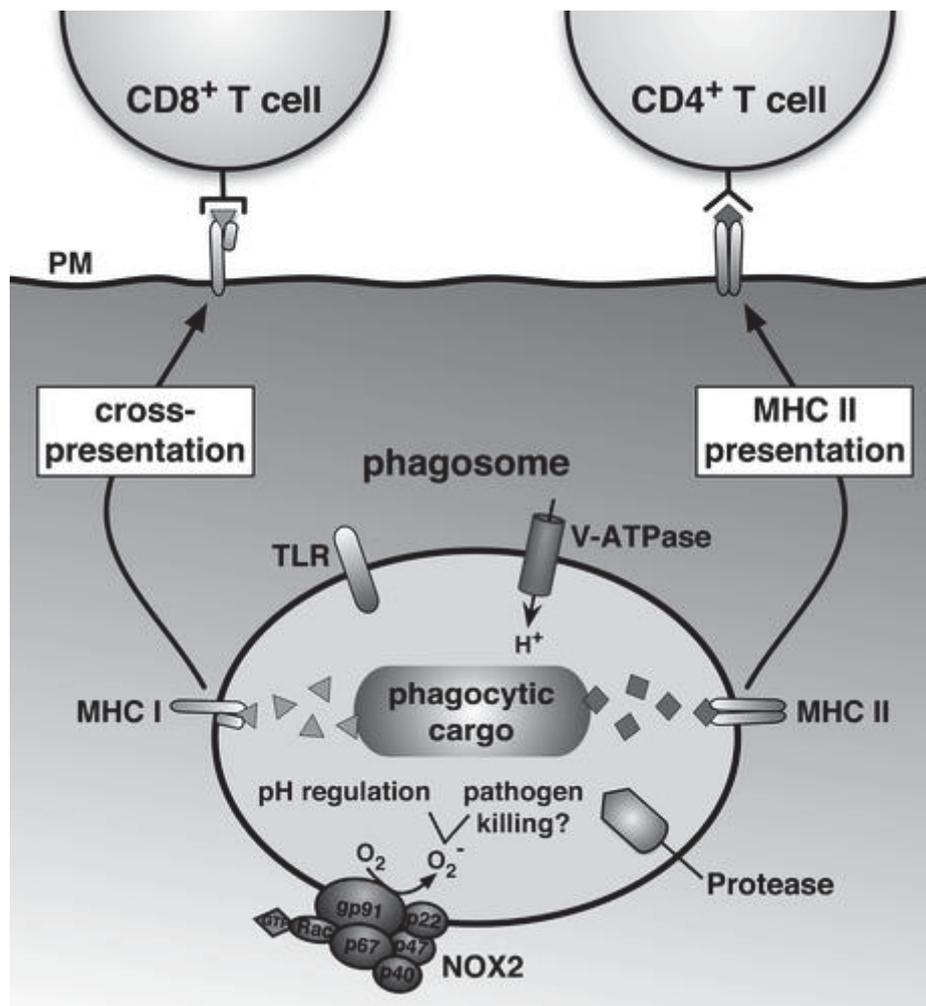
Les molécules CD1 sont des hétérodimères constitués d'une glycoprotéine de la famille du CMH-I non classique CD1 associée à la  $\beta$ 2-microglobuline. Chez l'homme, quatre protéines CD1 sont exprimées par les DC myéloïdes : CD1a, CD1b, CD1c et CD1d, alors que chez la souris seul le CD1d a été identifié (Salio et al., 2010).

Le trafic des protéines CD1 dans la cellule est similaire à celui des protéines du CMH-II car elles quittent le RE pour atteindre la surface de la cellule. Elles sont ensuite internalisées, formant des endosomes dans lesquels elles chargent les Ag lipidiques, avant de revenir à la surface pour présenter ces Ag aux LyT. Cependant, le chargement de certains auto-Ag comme le sulfatide ou le GM1 ganglioside, peut avoir lieu directement à la surface cellulaire. Le trafic de CD1 peut également être régulé par l'association avec la chaîne li, comme pour le CMH-II. Cette association a été montrée pour les isoformes CD1d et CD1a. (Salio et al., 2010)

#### **3.5.2.5. Implication de Nox2 dans l'apprêtement et la présentation des Ag**

L'importance de l'expression de Nox2 dans les DC et la participation des FRO dans la présentation antigénique a été récemment résumée par Kotsias *et al.* (Kotsias et al., 2013).

Les phagosomes des DC jouent un rôle important dans le processus de présentation de l'Ag. La maturation du phagosome des DC, par fusion avec les lysosomes, est lente par rapport au même processus dans d'autres phagocytes comme les macrophages. L'Ag persiste donc dans un environnement phagosomal avec moins des protéases, moins nocif, qui favoriserait leur présentation *via* les molécules de CMH-I et CMH-II. (Lennon-Dumenil et al., 2002) (Figure 31)



**Figure 31. Rôle de Nox2 et des FRO dans la présentation antigénique dans les DC.** La présentation de l'Ag via les molécules CMH II et la présentation croisée dépendent de l'environnement du phagosome, influencée par l'afflux de protons, la V-ATPase et des différentes protéases. Les FRO libérées par Nox2 régulent le pH intraphagosomal pour mieux préserver l'Ag favorisant une présentation antigénique efficace. D'après Kotsias *et al.* Antioxid Redox Signal 2013

L'expression de Nox2 dans les DC contribue donc à prévenir l'acidification du phagosome et des endosomes ; elle va permettre l'alcalinisation nécessaire à la présentation croisée de l'Ag (Mantegazza *et al.*, 2008). Le recrutement des vésicules contenant les composants membranaires de Nox2 vers les phagosomes est dépendante de la molécule Rab27a (Jancic *et al.*, 2007) ; les DC murines déficientes en Rab27a présentent un défaut dans la présentation croisée due à l'augmentation de la dégradation de l'Ag dans les phagosomes plus acides.

Le rôle de Nox2 et FRO dans la présentation de l'Ag par le CMH-II n'est pas totalement élucidée, cependant un défaut de présentation de l'ovalbumine (OVA) aux LyT CD4<sup>+</sup> par les DC déficientes en gp91phox ou Rac2 a été démontré (Savina *et al.*,

2009).

La production de FRO peut modifier la structure moléculaire de l'Ag, ou des protéines impliquées dans les fonctions du phagosome. Par exemple, la présentation de l'OVA aux LyT par les DC est améliorée par l'action de l'acide hypochloreux, la chloration de l'OVA permet sa liaison aux membranes cellulaires augmentant ainsi l'absorption de l'Ag, ainsi que la susceptibilité accrue à la protéolyse due à des changements conformationnels dans la structure de la protéine (Prokopowicz et al., 2010).

Les autophagosomes formés au cours de l'autophagie, sont une source d'Ag intracellulaires pour la molécule de CMH-II ; l'ion superoxyde et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induisent l'autophagie par inhibition de la cystéine protéase Atg4 (Scherz-Shouval et al., 2007).

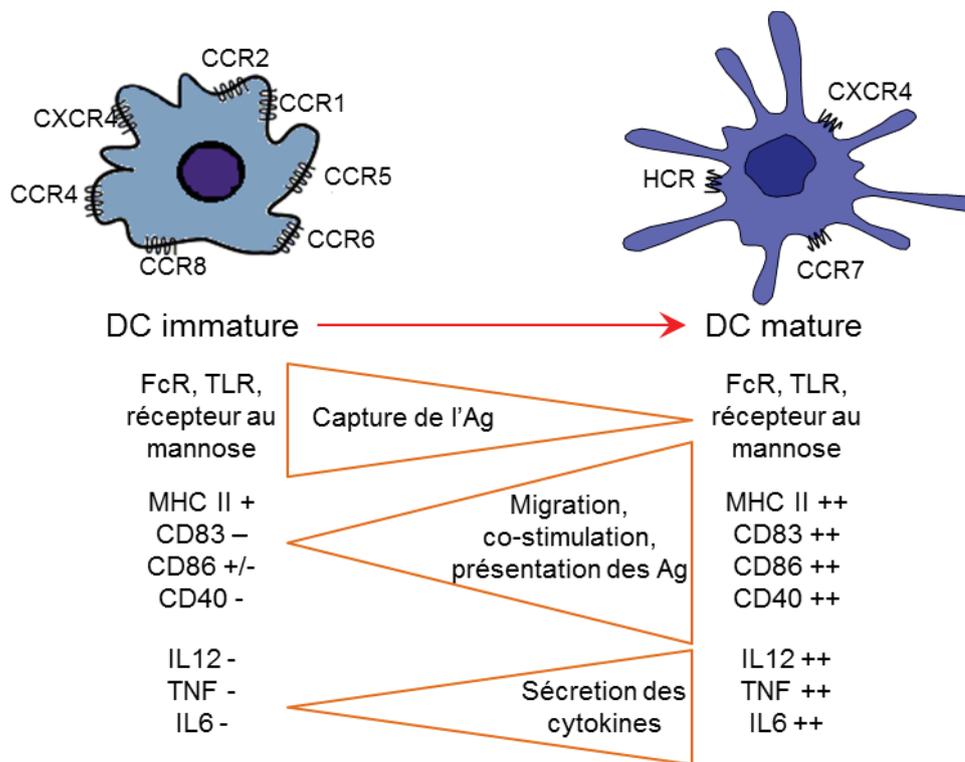
### **3.5.3. Maturation**

La maturation des DC est une étape fondamentale pour l'induction de la réponse immunitaire. Les DC immatures subissent ainsi des modifications morphologiques et fonctionnelles qui leur confèrent la capacité d'activer les LyT naïfs spécifiques des Ag qu'elles présentent. La maturation des DC peut être induite par des médiateurs pro-inflammatoires endogènes ou par des ligands qui se fixent sur des récepteurs tels que les TLR et les NLR, ou encore par une interaction avec un LyT exprimant le CD40 (Banchereau et al., 2000). Les voies de signalisation activées au cours de la maturation des DC par l'engagement des TLR sont présentées à la fin de ce chapitre (section 3.7.1).

Le processus de maturation induit une modification de la morphologie des cellules par un changement du cytosquelette. Les DC perdent leur forme initiale caractérisée par de larges feuilletts, pour acquérir une structure en étoile constituée de longs prolongements cytoplasmiques appelés dendrites (Figure 32). Elles perdent aussi l'expression des FcyR ainsi que leur capacité d'endocytose, avec une augmentation de l'expression de CD208 (DC-LAMP), une protéine lysosomale qui participe au chargement de l'Ag sur les molécules CMH.

Les molécules CMH-II, qui dans les DC immatures ont une demi-vie courte, sont exprimées en association avec un peptide antigénique de façon stable et abondante à la surface cellulaire. Le rôle des molécules CMH-II dans la DC n'est pas restreint à la

présentation antigénique ; suite à l'interaction avec les LyT, les molécules CMH-II induisent des signaux intracellulaires impliqués dans la prolifération, la synthèse des molécules co-stimulatrices, la libération de cytokines et l'apoptose. (Drenou et al., 2005; Setterblad et al., 2004)



**Figure 32. Maturation des DC.** L'activation des DC induit des changements morphologiques et phénotypiques qui vont leur permettre de migrer vers les ganglions et d'interagir avec les LyT pour une présentation antigénique adaptée. Ainsi, la production de cytokines par la DC va moduler la réponse adaptative et la diriger vers un profil effecteur ou tolérogène. Adapté de Nim C 2012

Les DC matures expriment alors des molécules leur permettant d'interagir avec les LyT en particulier des molécules d'adhérence cellulaire (comme CD54), des molécules de co-stimulation de la famille B7 (CD80, CD86, PD-L2, ICOS-L) et de la famille du TNF (CD137/4-1BBL, CD134/OX40L, CD70). La maturation modifie aussi la migration et l'activation des LyT. (Fancke and O'Keeffe, 2013)

### 3.5.4. Migration

Les DC ont une localisation différente selon leur état de maturation. Les DC immatures sont présentes en périphérie. Lors du processus de maturation, les DC acquièrent la capacité à migrer vers les organes lymphoïdes secondaires. Cette mobilité cellulaire dépend de l'expression de récepteurs de chimiokines par les DC et

de l'expression des chimiokines par les cellules des différents organes et tissus. Selon leur état de maturation, les DC n'expriment pas les mêmes récepteurs aux chimiokines, ce qui explique leur localisation différente (Figure 32). Les DC immatures expriment principalement des récepteurs de chimiokines inflammatoires tels que CCR1 (récepteur de CCL3, CCL5, CCL7), CCR2 (récepteur de CCL2, CCL8, CCL13), CCR5 (récepteur de CCL3, CCL4, CCL5), et CXCR4 (récepteur de CXCL12). Elles vont ainsi être attirées par les chimiokines CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) et CCL5 (RANTES) produites par les macrophages lors d'une inflammation. Les cellules de Langerhans expriment aussi le CCR6 (ligand de CCL20) favorisant ainsi leur recrutement vers l'épithélium. Après la capture de l'Ag, le processus de maturation des DC se traduit par une diminution de l'expression des récepteurs de chimiokines CCR1, CCR5 et CCR6 et par l'expression *de novo* de CCR7. Ce dernier va permettre la migration des DC vers les organes lymphoïdes secondaires *via* la lymphe, en réponse aux chimiokines CCL19 et CCL21. Chez la souris n'exprimant ni CCL19 ni CCL21, les DC sont incapables de migrer vers les ganglions lymphatiques drainants. (Fancke and O'Keeffe, 2013)

Les DC sont aussi une source de chimiokines. Les DC immatures sécrètent constitutivement CCL18 et CCL20 alors que les DC thymiques produisent préférentiellement CCL25, une chimiokine activant principalement les thymocytes et les macrophages. Suite au processus de maturation, les DC acquièrent la capacité de sécréter de nouvelles chimiokines comme CCL2, CXCL18, CXCL10, chimiotactiques pour les cellules de l'immunité innée. (Kaisho, 2012)

### 3.5.5. Activation des lymphocytes T

Arrivées dans les organes lymphoïdes secondaires, les DC matures ont pour fonction principale l'activation des LyT spécifiques. Les DC interagissent avec le récepteur des LyT (TCR) *via* les complexes CMH/peptide. En l'absence d'Ag, le contact entre les cellules n'est que transitoire. En présence d'Ag le contact cellulaire est plus long (atteignant jusqu'à 18 heures), soutenu ou intermittent, et permet d'engager l'entrée en mitose et la différenciation des LyT vers un phénotype effecteur et un phénotype mémoire. L'activation des LyT passe par la formation d'une synapse immunologique. Celle-ci correspond à une réorganisation de la distribution des protéines de surface ainsi que des protéines de signalisation, de transport intracellulaire et du cytosquelette. Elle se forme dans la zone de contact entre les membranes

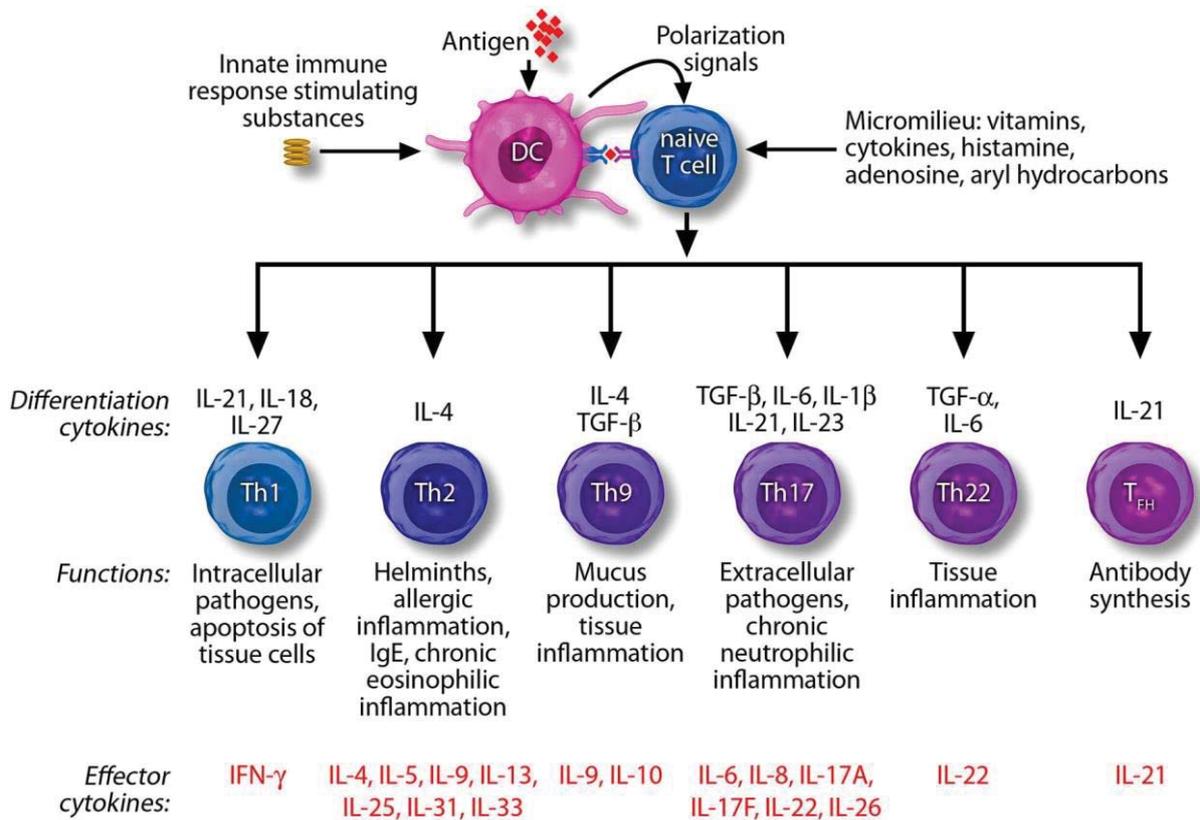
plasmiques des deux cellules (DC et LyT), zone où se concentrent, à la surface, les molécules d'adhérence, les molécules du CMH et les TCR, les molécules de co-stimulation et, dans l'espace intracellulaire, les cytokines secrétées. (Fooksman et al., 2010)

Chronologiquement, l'engagement du TCR avec le complexe CMH/Ag dans la DC constitue le premier signal. Il définit la spécificité de la réponse immunologique puisque la combinaison TCR/CMH/Ag est unique. Toutefois, ce signal est insuffisant pour activer complètement le LyT. En effet, des lymphocytes stimulés seulement par ce signal deviennent apoptotiques ou anergiques. L'engagement de quelques TCR initie des modifications du cytosquelette, permettant la redistribution d'autres TCR et des molécules de co-stimulation à la surface des LyT. (Mempel et al., 2004)

La formation de la synapse est consolidée par l'interaction forte entre les molécules LFA-1 et ICAM 2/3 exprimées à la surface du LyT et par les molécules ICAM-1 (CD54) et DC-SIGN (CD209) exprimées sur la DC mature. Plus le nombre de complexes CMH/Ag est important et plus cette fixation initiale est rapide et stable (Taflin et al., 2012). Par la suite, les molécules de co-stimulation présentes à la surface des LT sont recrutées au niveau de la synapse immunologique pour renforcer le dialogue entre la DC et le LyT, constituant ainsi la second signal d'activation (Mempel et al., 2004). L'engagement de la molécule CD28 augmente l'expression du gène de l'IL-2 et du gène anti-apoptotique Bcl-XL ce qui protège les cellules T du signal apoptotique conféré par l'engagement du TCR. D'autres molécules de co-stimulation participent au dialogue DC/LyT. Par exemple les interactions CD40/CD40L sont aussi impliquées dans la genèse de signaux co-activateurs.

### **3.6. Orientation de la réponse immunitaire**

Selon les signaux issus de l'environnement, la DC mature possède un phénotype particulier. Cette plasticité de maturation est mise en évidence par sa capacité à sécréter différentes cytokines définissant le troisième signal qui participe à l'orientation ou polarisation du phénotype des LyT CD4<sup>+</sup> activés (Magombedze et al., 2013). (Figure 33)



**Figure 33. Polarisation T en fonction des cytokines secrétées par les DC.** En fonction de l'Ag présenté et des cytokines présentes dans le microenvironnement, les LyT CD4<sup>+</sup> naïfs peuvent se différencier en Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, ou Th folliculaires (Tfh). D'après Akdis et al. J Allergy Clin Immunol 2012

La reconnaissance de pathogènes intracellulaires bactériens, viraux ou parasitaires par la DC induit une réponse de type **Th1**. Ainsi, elle va sécréter préférentiellement des cytokines appartenant à la famille de l'IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27), de l'IL-18 et des interférons de type I (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ ). Dans ce contexte, les LyT Th1 vont exprimer le facteur de transcription T-bet qui permet une synthèse élevée d'IFN $\gamma$ . Les cellules Th1 participent à la réponse cytotoxique qui vise à la destruction des cellules infectées, directement par expression de ligands activateurs de l'apoptose (FasL) et la production de cytokines cytotoxiques (TNF $\alpha$ ) ou indirectement en favorisant l'activation des LyT CD8<sup>+</sup> par production d'IL-2 ou bien encore par activation des macrophages par la production de l'IFN $\gamma$ . (Magombedze et al., 2013)

En revanche, la reconnaissance d'allergènes ou de parasites extracellulaires par les DC, mène à la sécrétion d'IL-4 et de CCL-2 qui oriente la réponse des LyT CD4<sup>+</sup> vers un phénotype **Th2** (Panzer et al., 2012). De même, l'engagement d'OX40 par son ligand OX40L semble favoriser cette orientation. Les LyT Th2 expriment le facteur de

transcription GATA-3 et libèrent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. La sécrétion de ces cytokines favorise la production d'IgE par les LyB et l'activation des mastocytes et des éosinophiles pour éliminer les pathogènes extracellulaires. (Magombedze et al., 2013)

Chaque sous-population a la capacité de s'auto-amplifier, inhibant de ce fait l'orientation inverse. Ainsi l'IL-2, produite par les Th1, stimule la prolifération des Th1 et la sécrétion d'IFN $\gamma$  inhibe la génération des Th2 et la sécrétion d'IL-4. Au contraire, l'IL-4, produite par les Th2, stimule la prolifération des Th2. (Liao et al., 2011)

Cependant, d'autres phénotypes effecteurs de LyT CD4<sup>+</sup> ont été décrits : **Th17**, **Th22**, **Th9**, **Tfh** et **Treg**. L'orientation Th17 semble avoir lieu en présence d'IL-23, de TGF $\beta$  ou d'IL-6 (Lee et al., 2012). Les LyT Th17 expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et secrètent de l'IL-17 et de l'IL-22 alors que les cellules Th22 produisent de l'IL-22 et pas d'IL-17. Ces deux types effecteurs de LyT CD4<sup>+</sup> participent à la protection contre les bactéries extracellulaires ; cependant les Th17 exacerbent l'inflammation alors que les Th22 l'atténuent (Akdis et al., 2012). De ce fait, les Th17 paraissent intervenir dans le développement de maladies auto-immunes comme la PR (Kushwah and Hu, 2011) et sont impliquées dans le rejet aigu lors de transplantations dans un modèle murin (Mahnke et al., 2007) et chez l'homme (Taflin et al., 2012).

Les LyT CD4<sup>+</sup> Th9 produisent de l'IL-9 et de l'IL-10 et favorisent la réponse inflammatoire (Veldhoen et al., 2008). Les LyT CD4<sup>+</sup> folliculaires, Tfh, restent dans les organes lymphoïdes secondaires et aident directement à la différenciation des Ly B spécifiques vers des plasmocytes. Ils produisent de l'IL-21 qui aide à la prolifération et à la différenciation en périphérie des LyB. (Crotty, 2011)

Outre leur capacité à induire une réponse immune effectrice, les DC participent aussi au maintien de la tolérance immunitaire par l'activation des LyT avec fonction régulatrice, les LyT régulateurs (Treg) (Bilate and Lafaille, 2012). Les Treg CD4<sup>+</sup> peuvent être classés en deux 2 groupes : les LyTreg « naturels » et les LyTreg « induits ». Chez l'homme, les **LyTreg naturels**, acquièrent leur fonction régulatrice directement dans le thymus au cours de leur maturation. Ils sont identifiés par le phénotype CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> (*Forkhead box P3*). Cependant, Foxp3 est aussi exprimé transitoirement dans les LyT humains activés sans déterminer d'activité régulatrice. Les Treg sont capables d'inhiber la prolifération des LyT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, la production d'anticorps et la commutation de classe des LyB, la cytotoxicité des cellules NK et NKT,

la maturation et la fonctionnalité des DC ainsi que les fonctions et la survie des PN. Les **LyTreg induits**, générés en périphérie ou *in vitro*, sont divisés en sous-populations : les CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> induits, les Treg Tr1 et les Treg Th3. Plusieurs médiateurs ont été identifiés comme inducteurs de la différenciation des Treg Foxp3<sup>+</sup> induits : l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui catalyse et épuise le tryptophane de l'environnement extracellulaire, l'acide rétinoïque, métabolite de la vitamine A, la vitamine D ou le TGFβ. La génération des Treg Tr1 requiert la production d'IL-10, d'IL-21 et l'expression de surface d'ICOSL par les DC. Ces LyT produisent de fortes quantités d'IL-10, d'IL-27 et de TGFβ, médiateurs de leur activité régulatrice. Enfin, les Treg Th3 sont associés aux muqueuses et participent à la tolérance induite par voie orale. Leur effecteur majeur est le TGFβ.

### 3.7. Implication des voies de signalisation dans la maturation des DC

L'engagement des ligands de TLR et du récepteur au TNF-α induit la maturation des DC par l'activation de nombreuses molécules impliquées dans les voies de signalisation majeures, telles que NFκB, MAP kinases (MAPK) et phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K).

#### 3.7.1. Activation des voies de signalisation communes aux TLR

L'engagement des différents TLR active des voies de signalisation communes aboutissant à l'activation de facteurs de transcription tels que NFκB, AP-1 ou les IRF (pour *Interferon Regulatory Factor*). Les TLR activent deux voies de signalisation, une voie de signalisation dépendante de la molécule adaptatrice MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) et une autre voie de signalisation indépendante de MyD88 (Sasai and Yamamoto, 2013). (Figure 34)

##### 3.7.1.1. Voie dépendante de Myd88

Myd88 est une des cinq molécules adaptatrices des TLR (Sasai and Yamamoto, 2013). Elle s'associe à tous les TLR à l'exception du TLR3 et elle est indispensable à la synthèse d'IL-6 et d'IL-12p40. MyD88 possède un domaine TIR (*Toll-interleukin 1 receptor*) lui permettant d'interagir avec le TLR et un domaine de mort DD (*death domain*) menant au recrutement de kinases IRAK (*interleukin-1 receptor associated kinase*). Il existe 4 molécules IRAK : IRAK-1, IRAK-2, IRAK-4, IRAK-M mais seules,

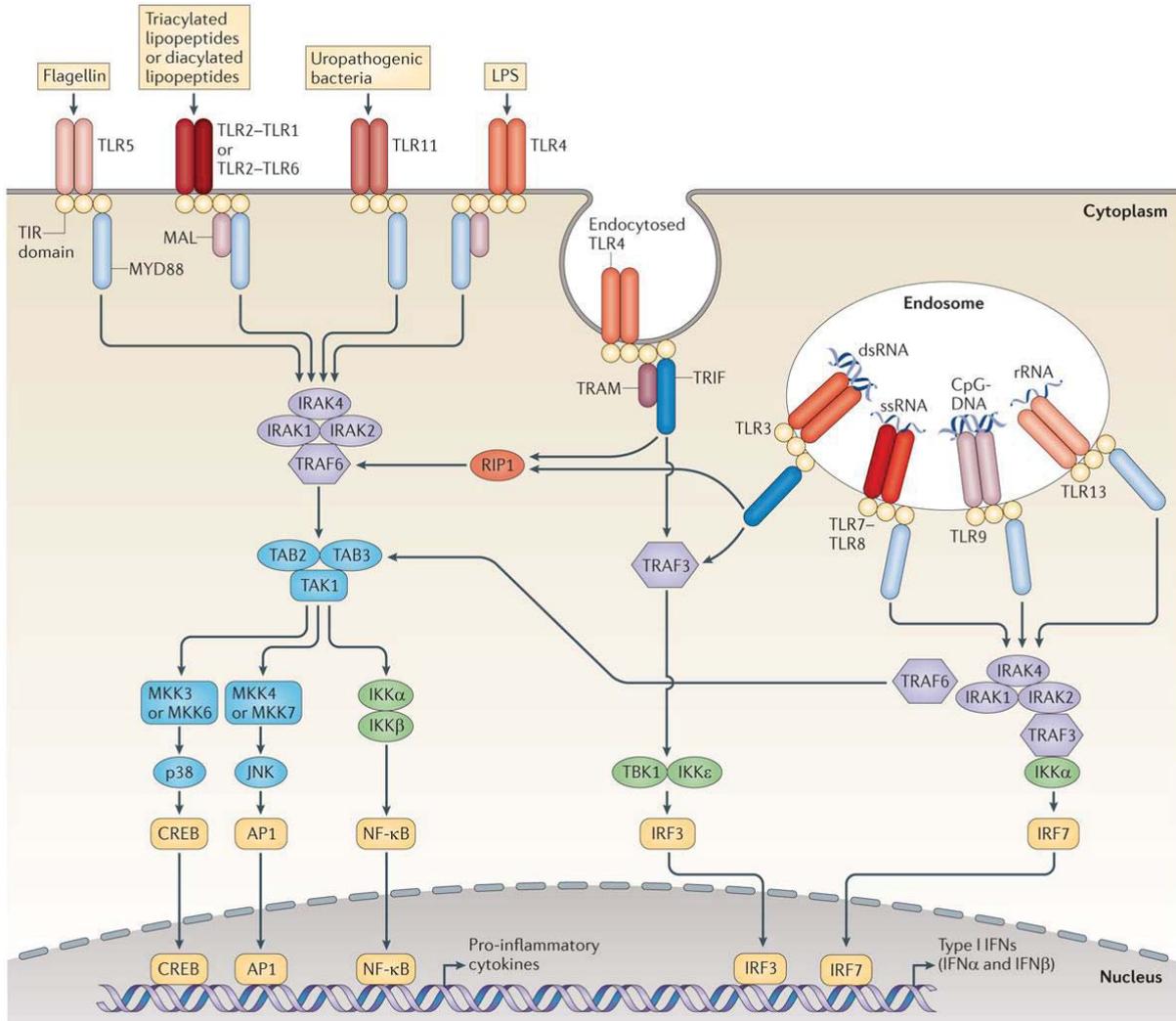
IRAK-4 et IRAK-1 ont une activité kinase intrinsèque. Le recrutement d'IRAK-4 par Myd88 induit celui d'IRAK-1 entraînant par la suite sa liaison avec la molécule TRAF-6 (*TNFR-associated factor-6*). Le complexe TRAF-6/IRAK-1 se désengage ensuite de son récepteur pour interagir avec le complexe TAK1 (*TGFβ-associated kinase-1*) / TAB1 (*TAK-1 binding protein-1*) / TAB2 situé au niveau de la membrane plasmique. IRAK-1 est ensuite dégradé et le complexe restant subit une translocation dans le cytosol où il se lie avec UBC13 (*ubiquitin-conjugating enzyme-13*) et UEV1A (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*). Ceci mène à l'ubiquitination de TRAF-6 induisant l'activation de TAK1. Cette dernière conduit à l'activation de l'IKK (*inhibitor of nuclear factor-κB-kinase*) qui, à son tour, phosphoryle les protéines IκBs libérant ainsi le facteur de transcription NFκB (voir la voie NF-κB ci-dessous). (O'Neill et al., 2013)

L'engagement de MyD88 amène aussi à l'activation des MAPK dont p38MAPK, JNK, et ERK. En effet, le complexe TAK-1/TAB1/TAB2 phosphoryle les kinases MKK4/7 et MKK3/6 qui activent JNK ou p38MAPK, respectivement. Les TLR activent aussi la MAPKKK Cot/Tpl2 entraînant ainsi l'activation de MEK1/2 qui, à son tour, phosphoryle ERK (voir la voie des MAPK ci-dessous). (Chuang et al., 2011)

Les TLR agissent enfin sur la voie de la PI3K par la formation d'un complexe entre Myd88 et PI3K. Ce complexe va ensuite induire la phosphorylation du phosphatidyl inositol biphosphate (PIP2) en phosphatidyl inositol triphosphate (PIP3) menant à l'activation de PDK-1 puis à celle d'Akt (voir la voie PI3K ci-dessous). (Laird et al., 2009)

### ***3.7.1.2. Voie indépendante de Myd88***

L'engagement du TLR3 et du TLR4 induit le recrutement de la molécule adaptatrice TRIF (*TIR domain containing Adapter Protein inducing IFN*), appelée aussi TICAM-1, qui active une voie de signalisation indépendante de MyD88. TLR3 recrute TRIF directement alors que TLR4 le fait par l'intermédiaire de la molécule adaptatrice TRAM (*TRIF Adapter Protein*). TRIF, induit l'activation de TRAF-6 ou de RIP-1 (*receptor interacting protein-1*) entraînant l'activation des IKK afin d'activer NF-κB. Par ailleurs, TRIF interagit également avec IKK ε et TBK-1 (*TANK-binding kinase 1*) phosphorylant ainsi le facteur de transcription IRF3 nécessaire à la production des IFN. (O'Neill et al., 2013)



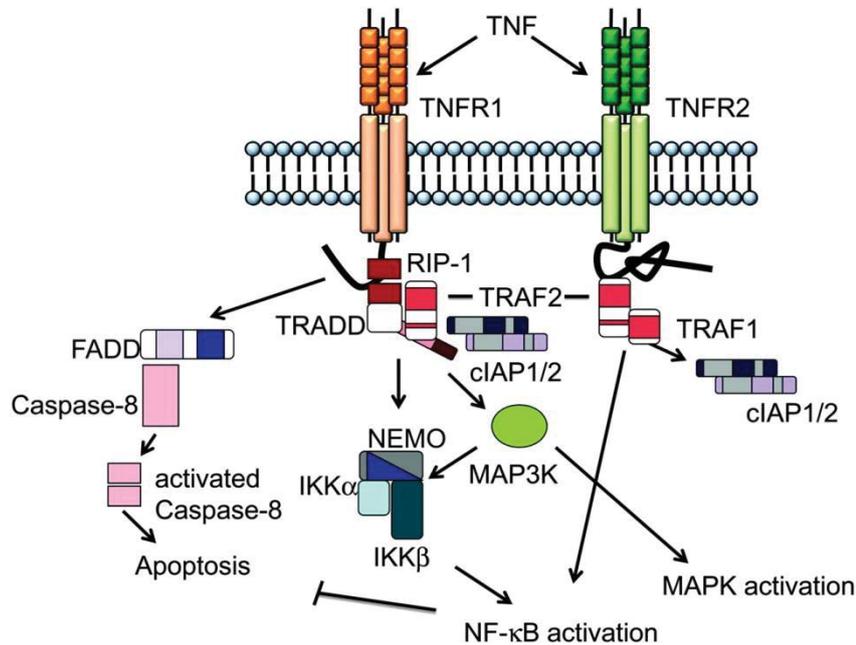
**Figure 34. Voies des signalisation activées dans les DC par les TLR.** D'après O'Neil et al. Nat Rev Immunol 2013

### 3.7.2. Activation des voies de signalisation par les récepteurs au TNF

Les effets du TNF $\alpha$  sur les DC passent par l'activation de deux récepteurs distincts exprimés à sa surface : TNF-R1 et TNF-R2 (Figure 35). Toutefois, seul TNF-R1 est impliqué dans les changements fonctionnels et phénotypiques des DC. (Bluml et al., 2012)

Le TNF-R1 est exprimé à la surface cellulaire sous forme de trimère. La liaison du TNF $\alpha$  au TNF-R1 engendre la libération de la molécule SODD (*silencer of death domain*), ce qui permet la fixation de la protéine TRADD (*TNFR-associated DD protein*), protéine cytoplasmique contenant une région DD. TRADD recrute RIP-1 et TRAF-2 (une E3 ubiquitine ligase). Ce complexe TRADD/TRAF-2/RIP-1 se désengage du récepteur et recrute MEKK-3 (*MAPK Kinase Kinase*) et TAK-1 qui permettent la dégradation d'I $\kappa$ B et la libération de NF $\kappa$ B. Par ailleurs, ce complexe, par le recrutement

d'ASK-1 (*apoptosis-signalling kinase-1*) active les kinases MEK-4 et MEK-6 qui activent p38MAPK et JNK. TNF-R1 active aussi d'autres voies de signalisation dont Ras-Raf-MEK1-ERK et PI3K mais les mécanismes impliqués restent actuellement mal connus.



**Figure 35. Schéma de la signalisation initiée par TNFR1 et TNFR2.** D'après Blüml et al, Int Immunol 2012

### 3.7.3. Voie NFκB

La famille NFκB est composée de facteurs de transcription dimériques contenant un domaine RHD (Rel-homology domain) qui se lie au niveau du site κB présent dans les régions promotrices de nombreux gènes. Il existe, chez les mammifères, cinq membres de la famille NFκB: RelA (p65), RelB, C-Rel, p105 (NF-κB1, précurseur de p50), p100 (NF-κB2, précurseur de p52). Les protéines NFκB forment des homo- ou des hétérodimères et régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, l'inflammation et l'immunité. (Oeckinghaus et al., 2011)

Au repos, NFκB est séquestré dans le cytoplasme sous une forme inactive du fait de son interaction avec une famille de protéines inhibitrices appelée IκBs. Cette famille est composée de sept membres (IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε, Bcl-3, IκBζ et IκBS). IκBα, IκBβ, IκBγ et IκBε empêchent la localisation nucléaire de NF-κB alors que Bcl-3, IκBζ et IκBS, présents dans le noyau, interagissent avec NFκB pour réguler son activité transcriptionnelle. (Figure 36)

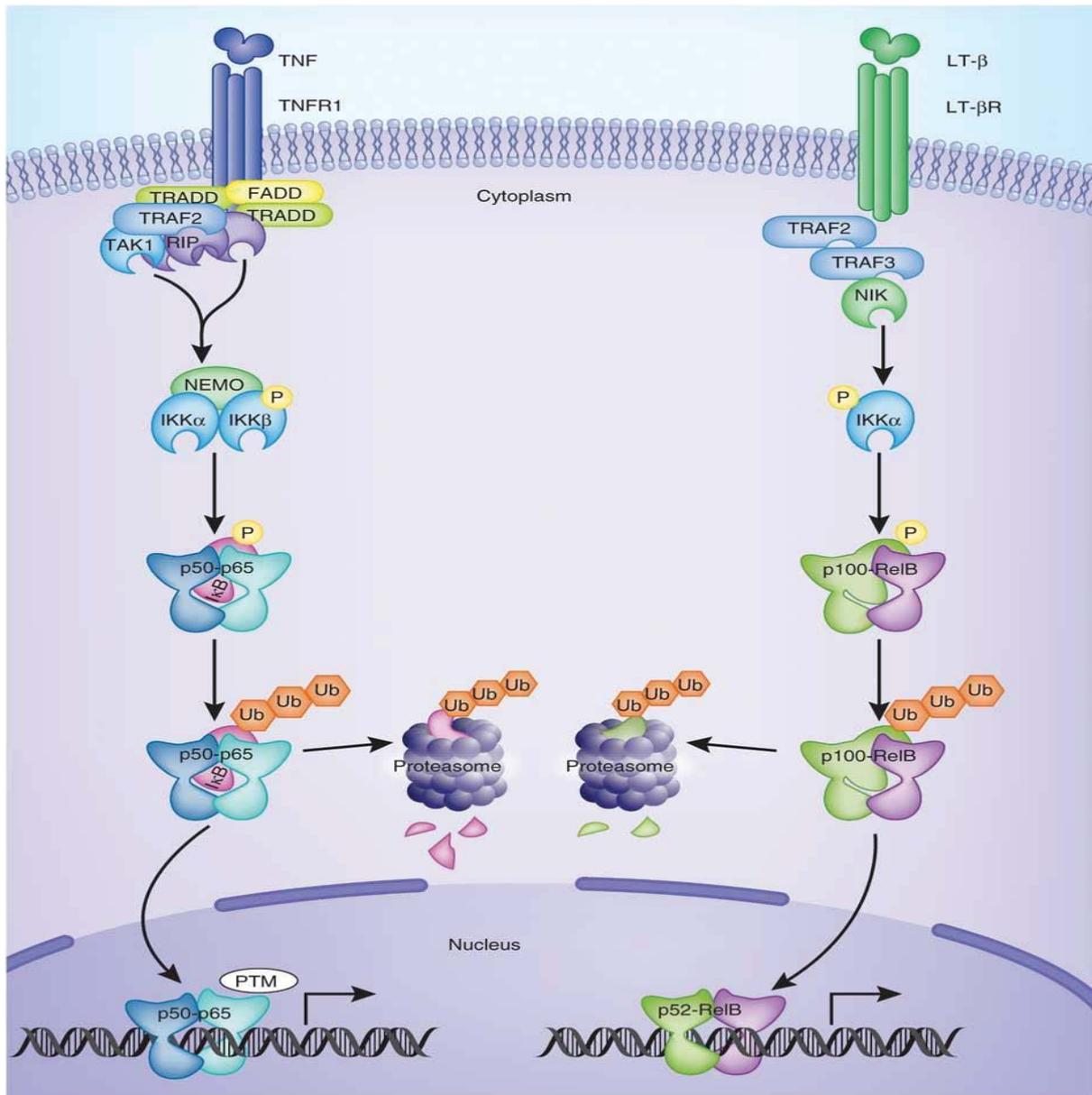


Figure 36. Voie de signalisation NFκB. D'après Oeckinghaus et al. Nat Immunol 2011

La forme activée de NFκB la plus fréquente est composée de RelA et de p50. Ce hétérodimère est séquestré dans le cytoplasme sous une forme inactive par l'interaction avec IκBs. Lors de l'activation des DC par divers *stimuli*, IκB est phosphorylé par un complexe kinase IKK. Ce dernier est composé de deux molécules catalytiques : IKKα et IKKβ et une molécule régulatrice NEMO (*NFκB essential modulator*). Les protéines IκB phosphorylées sont poly-ubiquitinylées et dégradées par le protéasome 26S, permettant à NFκB actif (p65 / p50) de migrer dans le noyau. Cette voie, dite classique ou canonique, est la principale voie d'activation de NFκB. Les sous-unités p50 et C-Rel semblent réguler des gènes importants pour l'activation des LyT par les DC (CD40, IL-12, IL-6) alors que RelA (p65) paraît davantage participer à l'expression des gènes de

cytokines inflammatoires tels que le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-6.

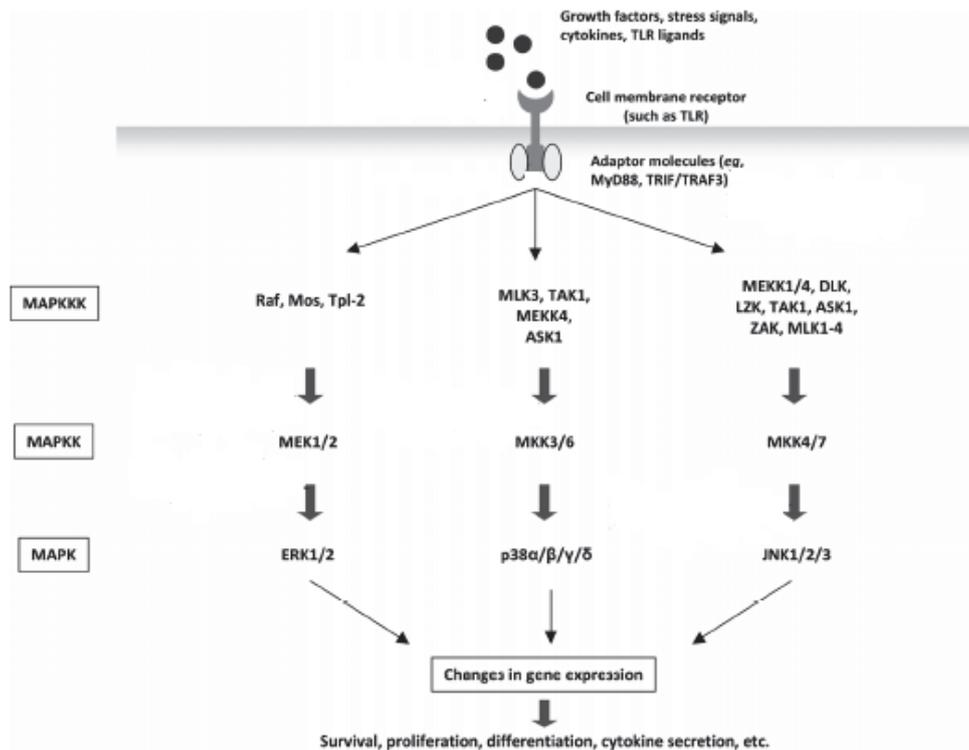
Une voie alternative ou non canonique d'activation de NF $\kappa$ B peut être engagée suite à une stimulation par CD40 ou certains membres de la famille du TNF $\alpha$ , conduisant à la formation de l'hétérodimère p52/RelB. La molécule p100, précurseur du p52, est retenue dans le cytoplasme par un domaine inhibiteur de la translocation nucléaire. Suite à une stimulation, l'ubiquitination de p100 entraîne sa dégradation partielle et la génération de p52 mature. Cette dernière forme ensuite un hétérodimère avec RelB pour réguler l'expression de gènes cibles.

#### **3.7.4. Voie des MAPK**

Les MAPK définissent une famille de protéines impliquées dans la transduction de signaux conduisant à la prolifération, à la différenciation, ou encore à l'apoptose de nombreuses cellules. Chez les mammifères, la voie des MAPK joue aussi un rôle important dans la réponse immune en intervenant aussi bien dans l'initiation de la réponse immune innée, dans l'activation de la réponse adaptative, que dans la mort cellulaire. (Figure 37)

Cette famille de protéines peut être divisée en 3 groupes selon leur motif d'activation Thréonine-X-tyrosine : ERK (motif Thréonine-Glutamate-Tyrosine) ; JNK (motif Thréonine-Proline-Tyrosine) ; p38MAPK (motif Thréonine-Glycine-Tyrosine).

Ces protéines sont phosphorylées par des kinases situées en amont dont les MAPKKK (ou MEKK) puis les MAPKK (ou MEK). Les MAPK vont alors, à leur tour, phosphoryler différents substrats en aval tels que des protéines kinases, des facteurs de transcription ou des phospholipases. Les protéines JNK et p38MAPK sont fortement activées au cours de la réponse inflammatoire alors qu'ERK est principalement phosphorylée par des facteurs de croissance. (Martin and Jiang, 2010)



**Figure 37. Voie de signalisation MAPK.** La transduction du signal *via* TLR conduit à l'activation des trois groupes de MAPK (ERK, p38 et JNK) par une cascade en trois étapes comme il est indiqué sur la gauche de la figure (MAPKKK, MAPKK et MAPK). D'après Martin et Jiang, *Anticancer Agents Med Chem* 2010

#### 3.7.4.1. p38MAPK

La voie p38MAPK joue un rôle crucial lors de la maturation des DC par le LPS ou par le TNF $\alpha$ . Son activation participe à l'expression de diverses protéines par des mécanismes transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. La kinase p38 participe ainsi à la régulation de l'expression des molécules du CMH-II, des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86) et de maturation (CD83) ; elle est aussi impliquée dans la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12p40, l'IL-12p70 et le TNF $\alpha$ . Enfin, elle contribue à la forte capacité allo-stimulatrice des DC matures ainsi qu'à la perte de l'endocytose. (Martin and Jiang, 2010)

#### 3.7.4.2. ERK

Contrairement à la voie p38MAPK, la voie ERK semble bloquer certaines fonctions des DC matures. Après une stimulation par le LPS ou le TNF $\alpha$ , un inhibiteur d'ERK n'inhibe pas l'expression du CMH-II, du CD40, du CD80, du CD86 ni du CD83 suggérant qu'ERK régule négativement la maturation phénotypique. De plus, ERK

réduit la sécrétion d'IL-12p40 et d'IL-12p70 après stimulation. Toutefois, la stimulation d'ERK augmente la production d'autres cytokines inflammatoires dont l'IL-6, le TNF $\alpha$ , l'IL-8 et l'IL-1 $\beta$ . Suite à une activation par un ligand de TLR2, ERK semble conduire à une forte sécrétion d'IL-10. Enfin, ERK diminue la capacité des DC à activer des LyT allogéniques. (Martin and Jiang, 2010)

#### 3.7.4.3. JNK

Comme la voie p38MAPK, la voie JNK participe à l'expression des molécules de co-stimulation CD80, CD86, CD54 et de maturation CD83 mais ne semble pas participer à celle des molécules du CMH-II ni de CD40. JNK favorise également la sécrétion de cytokines inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IL12p70 dans les DC activées par le LPS. Néanmoins la voie JNK ne semble pas réguler la sécrétion d'IL-6 ni d'IL-12p40. Enfin, cette voie paraît partiellement impliquée dans la perte de l'endocytose des DC matures mais n'intervient pas dans la capacité allo-stimulatrice de ces cellules. (Martin and Jiang, 2010)

#### 3.7.5. Voie PI3K

Les PI3K appartiennent à la sous famille des lipides kinases et sont séparées en 3 classes selon leur spécificité de substrats et leurs mécanismes de régulation. La classe I est sous divisée en 2 groupes : la classe IA et la classe IB. Les PI3K de classe IA sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité catalytique p110 et d'une sous unité p85 permettant leur interaction avec les récepteurs tyrosine kinases. Les PI3K de classe IB surtout exprimées par les cellules hématopoïétiques possèdent une sous unité catalytique p110 $\gamma$  et une sous unité régulatrice p101 facilitant les interactions avec les protéines G associées aux récepteurs à 7 domaines transmembranaires. Les PI3K de classe II et III sont encore mal caractérisées et ont pour substrat le phosphatidylinositol. (van de Laar et al., 2012)

La voie PI3K semble réguler négativement la réponse engendrée par les ligands de TLR. En effet, l'inhibition de PI3K dans des DC activées par divers *stimuli* mène à l'augmentation de l'activité de NF $\kappa$ B. Ceci s'explique en partie par le fait qu'en bloquant la PI3K, l'inhibition de GSK3 induite par Akt est levée ; or, GSK3 peut réguler l'expression de gènes impliqués dans l'activation de NF $\kappa$ B. (Fukao and Koyasu, 2003) (Figure 38)

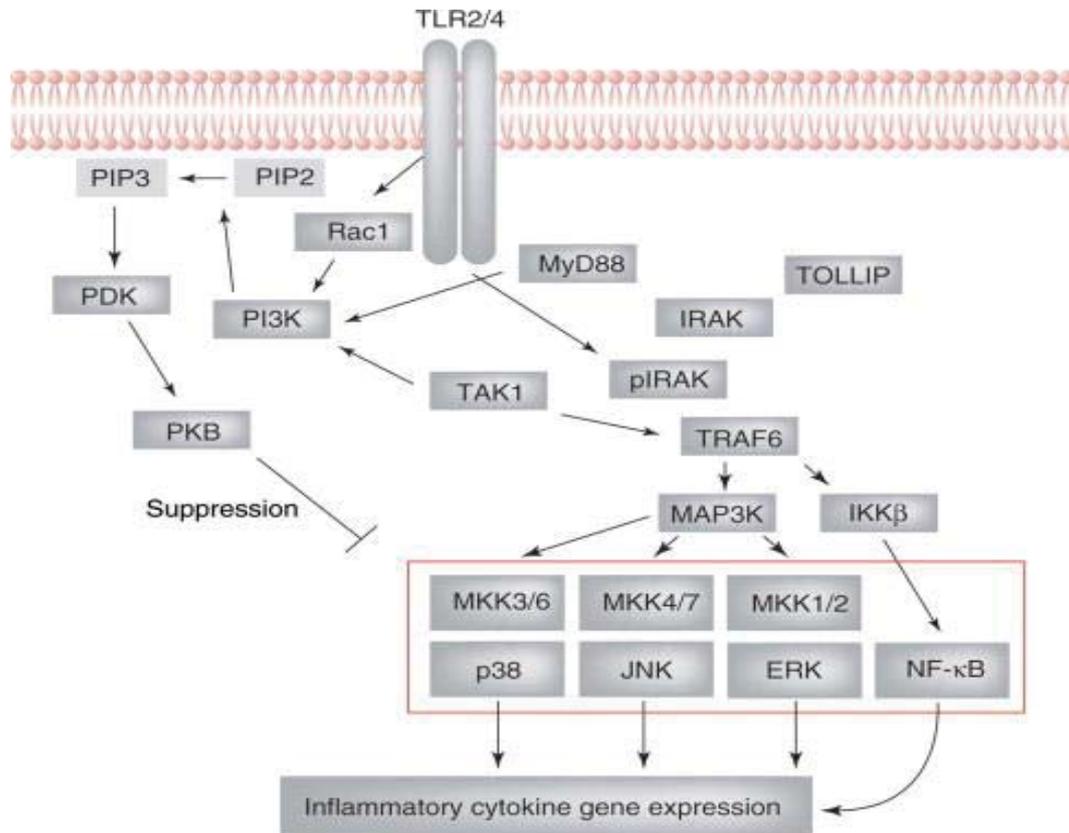


Figure 38. Régulation négative de la signalisation TLR par PI3K dans les cellules immunitaires innées. D'après Fukao et Koyasu, Trends Immunol 2003

La voie PI3K semble également être essentielle dans la balance Th1/Th2 en limitant la sécrétion d'IL-12 favorisant ainsi une orientation Th2 ou en inhibant une réponse Th1. En effet, des souris invalidées pour cette voie sont incapables de générer une réponse Th2. Outre sa capacité à moduler l'activation de NFκB, la voie PI3K semble aussi pouvoir inhiber la voie p38MAPK bloquant ainsi la transcription de gènes dont l'IL-12p40 et l'IL-12p35. La PI3K active Akt, ce qui engendre la phosphorylation d'ASK1, une MAPKKK, aboutissant à la perte de l'activité de l'ASK1 kinase. Cette dernière supprime ainsi l'activité de MKK3 ou MKK6, molécules situées en amont et responsables de la phosphorylation de p38MAPK. De plus, Akt bloque l'activité d'une autre MAPKKK, MEKK3 impliquée aussi dans la phosphorylation de p38MAPK. (Fukao and Koyasu, 2003)



	<p><i>Chapitre 4 :</i> <i>L'interaction entre</i> <i>les PN et les DC</i></p>	
--	---	--



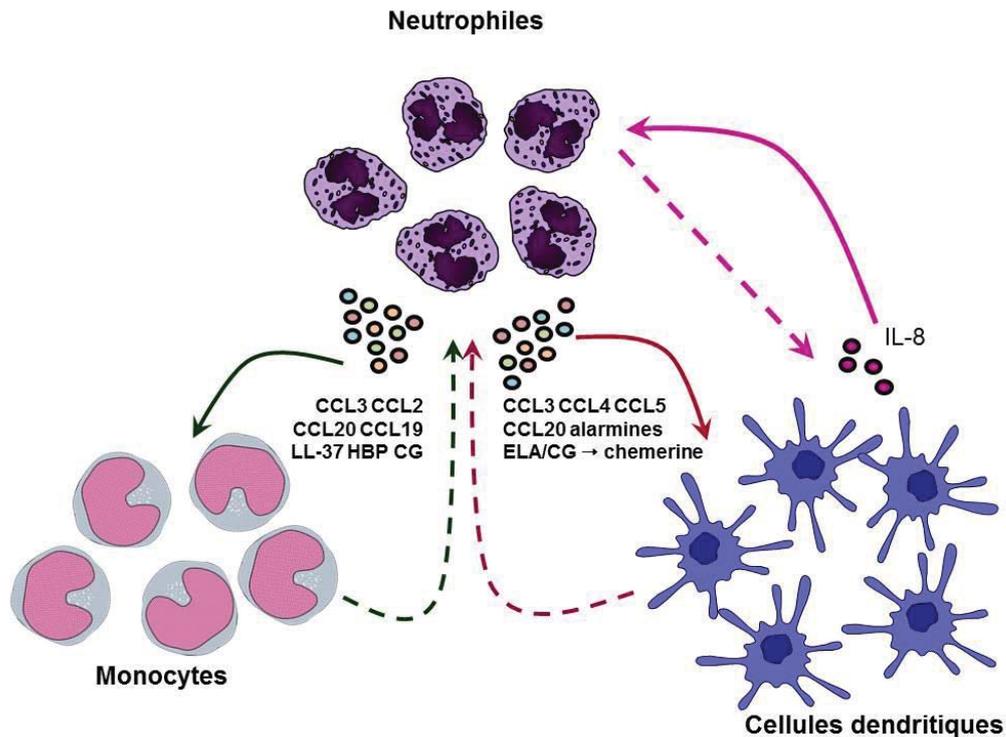
Le rôle des PN dans l'immunité a été longtemps limité à la phase aiguë de l'inflammation et à la résistance contre les agents pathogènes extracellulaires. Toutefois, les données actuelles indiquent que les PN peuvent également jouer directement un rôle dans l'immunité adaptative, non seulement par le recrutement d'autres cellules immunitaires vers le site de l'inflammation, mais aussi par la modulation de leur fonction.

Dans les tissus, les PN vont établir des communications complexes avec des éléments du stroma, avec des cellules de l'immunité innée et avec certaines sous-populations lymphocytaires (Amulic et al., 2012; Cassatella et al., 2009; Jaillon et al., 2013). Les PN peuvent participer au recrutement et à l'activation des macrophages (Silva, 2010a; Silva, 2010b). Ils vont coopérer avec les cellules NK, comme par exemple au cours de la légionellose où l'absence de PN aurait un impact négatif sur l'activation fonctionnelle des NK (Costantini and Cassatella, 2011; Jaeger et al., 2012). D'autre part, il a été récemment décrit que les PN qui atteignent la rate, interagissent avec des LyB de la zone marginale et contribuent à la régulation de la réponse humorale indépendamment des LyT (Puga et al., 2012). Les PN communiquent aussi avec les LyT ; par exemple, les PN activés induisent la migration des cellules Th1 et Th17 grâce à la production de CCL2, et CXCL10 ou CCL2 et CCL20, respectivement (Pelletier et al., 2010).

L'activation des DC peut aussi être modulée par les PN (Ludwig et al., 2006; Schuster et al., 2012; van Gisbergen et al., 2005a). Ce mécanisme de régulation étant celui sur lequel notre travail expérimental de thèse est basé, le présent chapitre résume principalement les données de la littérature démontrant l'effet des PN sur les DC (activation et/ou régulation) et l'activation lymphocytaire T ultérieure.

#### **4.1. La migration dirigée des PN et des DC vers le site inflammatoire**

Pour garantir la communication entre les PN et les DC, ces cellules doivent être présentes au même endroit, au même moment. Au cours de la réponse inflammatoire, les PN activés sécrètent de nombreuses chimiokines ayant la capacité de recruter et d'induire l'accumulation de leucocytes dont les DC (Scapini et al., 2000; Scapini et al., 2001) (Figure 39). Quelques exemples sont résumés ci-dessous, afin d'illustrer ce phénomène important.



**Figure 39. Chimiotactisme croisé des PN et des DC.** Les PN produisent des médiateurs solubles capables d'attirer les DC et certains de leurs précurseurs (monocytes) au site inflammatoire. En parallèle, les DC peuvent attirer les PN par la production d'IL-8 par exemple. Les lignes continues correspondent aux cellules cibles des molécules libérées, les lignes discontinues représentent la direction de migration des cellules cibles en réponse à ces molécules.

Dans le cas de l'activation des PN par des protozoaires comme *Toxoplasma gondii*, des chimiokines responsables du recrutement des DC sont libérées comme CCL3, CCL4, CCL5 ou CCL20 (Bennouna et al., 2003). L'exposition de PN de souris résistantes à *Leishmania major*, un autre protozoaire, induit la libération de CCL3 (Charmoy et al., 2010). Cette chimiokine est essentielle pour le recrutement des mo-DC sur le site de l'infection ; la déplétion *in vivo* des PN par un anticorps monoclonal inhibe le recrutement de ces DC. Dans le même cadre, l'ingestion de *Mycobacterium tuberculosis* par les PN influence aussi la migration des DC ; les DC qui ont ingérées des PN infectés avec *M. tuberculosis* ont des capacités migratoires meilleures que les DC qui ont internalisé directement la bactérie (Blomgran and Ernst, 2011).

Les PN sont aussi capables, par plusieurs mécanismes, d'attirer au site inflammatoire des monocytes, qui pourront se différencier en DC comme décrit dans le chapitre précédent. Les PN activés libèrent des chimio-attractants classiques comme

CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ) et CCL19 (MIP-3 $\beta$ ) (Scapini et al., 2001). De plus, de manière originale, les PN utilisent certaines de leurs protéines granulaires pour induire la mobilisation de monocytes *in vivo*, comme par exemple LL-37, les défensines l'azurocidine (HBP/CAP37), la LF et la CATG. Ces molécules contribuent à l'attraction des DC soit directement, soit indirectement en induisant la forte production de CCL3 et CCL5 (de la Rosa et al., 2008; Yang et al., 2000a; Yang et al., 2000b; Yang et al., 2007). Le recrutement des monocytes est également favorisé indirectement par les PN grâce à la régulation positive de facteurs d'adhérence endothéliale, l'augmentation de la perméabilité trans-endothéliale, la production de facteurs chimio-attractants par d'autres types cellulaires et la modulation de l'activité de ces chimiokines par traitement protéolytique (Soehnlein et al., 2009) (Figure 39). De plus, les PN libèrent des protéases, telles que la CATG et l'ELA, qui peuvent convertir des chimiokines inactives non classiques, comme la pro-chemerine, en molécules chimio-attractantes (Wittamer et al., 2005).

Les DC produisent également des chimiokines en réponse à différents *stimuli* de maturation (TNF $\alpha$  ou LPS) ; en particulier, l'IL8, produite rapidement, est fortement chimioattractante pour les PN et se trouve ainsi à l'origine d'une boucle d'auto-amplification du regroupement des PN et des DC. (Sallusto et al., 1999; Scimone et al., 2005).

## **4.2. Les interactions PN-DC induisent des modulations fonctionnelles**

Dans le paragraphe précédent, nous avons vu que la production de chimiokines par les PN et les DC activés assure la migration de ces deux types cellulaires au site inflammatoire. Donc, au cours de la réponse inflammatoire, ces cellules vont établir des communications à l'origine de modulations fonctionnelles variées. L'ensemble de ces données sont résumées dans la Figure 40.

### **4.2.1. Les PN régulent la maturation et l'activation des DC**

La première mise en évidence de cette coopération fonctionnelle a été présentée par Bennouna et *al.*, qui ont montré que le surnageant de culture de PN de souris stimulés par *T. gondii* induisait *in vitro* la maturation de DC, ainsi que la production d'IL-12 et de TNF $\alpha$ . Le TNF $\alpha$  produit par les PN serait à l'origine de cet effet. La

pertinence *in vivo* a été démontrée dans un modèle de souris dépourvues de PN et infectées par *T. gondii* (Bennouna et al., 2003; Bennouna and Denkers, 2005).

D'autres études ont démontré l'importance de la liaison entre DC-SIGN, Mac-1 (CD11b/CD18) et CEACAM1 (CD66a) (Bogoevska et al., 2006; van Gisbergen et al., 2005b; van Gisbergen et al., 2005c). La protéine de surface DC-SIGN est une lectine de type C, exprimée par les DC, présentant une forte spécificité pour les glucides de type Lewis<sup>X</sup> non sialylés et pour les structures riches en mannose (Appelmelk et al., 2003). Les PN expriment quelques protéines riches en ce type de glucides, en particulier Mac-1 et CEACAM1 (Lucka et al., 2005; Skubitz and Snook, 1987) dont l'expression augmente au cours de l'activation. De ce fait, les PN activés peuvent fortement se fixer au DC-SIGN des DC. La maturation des DC nécessite par contre un second signal, comme la libération ou l'expression du TNF $\alpha$  par les PN (van Gisbergen et al., 2005b; van Gisbergen et al., 2005c).

L'interaction cellulaire directe entre les PN et les DC a été aussi montrée *in vivo* chez des patients atteints de la maladie de Crohn (van Gisbergen et al., 2005c). Dans la muqueuse colique de ces patients se trouvent deux populations de DC qui peuvent être distinguées par l'expression de CD83 et DC-SIGN (te Velde et al., 2003). On observe que des DC DC-SIGN<sup>+</sup> et des PN exprimant CEACAM1 et/ou Mac-1 y sont en contact.

Parmi les médiateurs solubles libérés par les PN activés, les alarmines comme l' $\alpha$ -défensine, les cathélicidines et la LF (Yang et al., 2009) peuvent activer les DC. Les défensines utilisées comme adjuvants sont capables d'induire la maturation des DC et d'augmenter la réponse adaptative (Lillard et al., 1999). Le peptide antimicrobien LL-37 (forme mature de la cathélicidine hCAP-18), est capable d'induire la différenciation et la maturation des moDC (Bandholtz et al., 2006; Davidson et al., 2004); de plus, en se fixant à l'ADN, elle le rend immunogène et ce complexe a la capacité d'activer les pDC (Lande et al., 2007). Pour sa part, la LF agit comme une alarmine ayant la capacité d'activer les moDC et les DC CD1c<sup>+</sup> (BDCA-1) (de la Rosa et al., 2008; Spadaro et al., 2008); ces DC présentent une augmentation de molécules de maturation à leur surface, produisent des cytokines pro-inflammatoires, et acquièrent la capacité à migrer vers les organes lymphoïdes suivant la chimiokine CCL21.

Ces alarmines ont aussi été décrites comme inhibitrices de l'activation des DC dans certaines conditions. C'est le cas de la cathélicidine LL-37 ; elle diminue l'activation des moDC sous l'effet d'agonistes de TLR (LPS, flagelline et acide lipotéichoïque), effet répercuté sur la capacité de ces DC à activer les LyT (Kandler et al., 2006). Cet effet anti-inflammatoire original a été confirmé *in vivo* dans un modèle murin de dermatite de contact en utilisant l'homologue murin de LL37, mCRAMP ; il agit au niveau de la phase de sensibilisation *via* l'inhibition de la voie de TLR4 (Di Nardo et al., 2007).

La LF possède aussi un rôle modulateur de la réponse inflammatoire, grâce à sa capacité de séquestrer le LPS pour protéger l'organisme du choc septique (Drago-Serrano et al., 2012) et à réguler négativement l'activation cellulaire *via* TLR-4 (Ando et al., 2010).

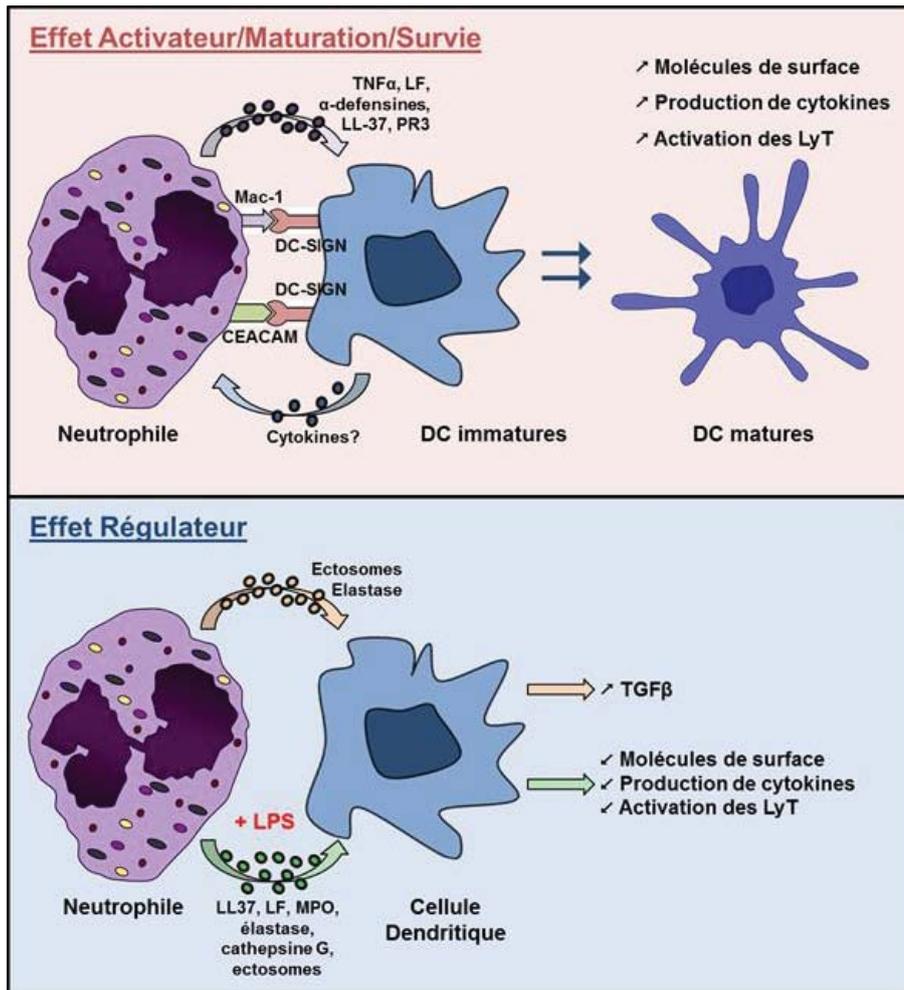
La MPO, une autre protéine présente dans les granulations des PN, a récemment été décrite comme molécule modulatrice de la maturation des DC (Odobasic et al., 2013). Dans ce travail, il a été montré que la MPO libérée par les PN dans les ganglions lymphatiques interagissait avec les DC *in vivo* lors de l'induction de la réponse adaptative. De plus, *in vitro*, la MPO, *via* la génération de dérivés enzymatiques réactifs, atténue l'immunité adaptative en inhibant l'activation des DC murines et humaines, la prise en charge de l'Ag et la migration aux ganglions.

Maffia et al., ont également décrit que l'ELA est capable de réguler négativement les DC et d'induire la production de TGF $\beta$  (Maffia et al., 2007). Dans un modèle *in vitro* de co-culture des PBMC et PN activés par le LPS ou *C. albicans*, l'ELA et aussi la CATG libérées par les PN diminuent la production des cytokines pro-inflammatoires par les DC (Gresnigt et al., 2012).

A la différence de ces protéases, l'incubation de la PR3 issue des PN active les DC. Elle induit l'expression de molécules de la maturation (CD83 et HLA-DR), des molécules de co-stimulation (CD40, CD86 et CD80) et de plus, ces DC acquièrent la capacité d'activer les LyT (Csernok et al., 2006).

Au cours de leur activation, les PN peuvent aussi libérer des microparticules dérivées de la membrane cellulaire, les ectosomes (Hess et al., 1999). Eken et al., ont montré que ces ectosomes inhibaient la maturation de moDC sous l'effet du LPS (Eken et al., 2008). De plus, ils ont observé que la présence des ectosomes inhibait aussi la

formation de dendrites et la capacité de phagocytose. Deux mécanismes seraient responsables de cette régulation négative des DC. Le premier serait dû à la phosphatidylsérine exprimée à la surface des ectosomes, le second à la production de  $TGF\beta$ , à la fois par les DC immatures et les DC stimulées par le LPS. Ces travaux ont été confirmés par notre équipe et complétés par une étude de voies de signalisation et des gènes régulateurs impliqués dans cette reprogrammation des DC (Turbica et al, 2013, manuscrit en préparation).



**Figure 40. Modulation de l'activation des DC par les PN.** Les PN, selon le contexte inflammatoire, peuvent moduler positivement ou négativement les DC ; le contact cellulaire et/ou la libération des médiateurs solubles comme le TNF $\alpha$ , les alarmines ou la PR3, par exemple, induisent la maturation des DC. A l'inverse, ce même contact cellulaire et la production d'autres médiateurs solubles par les DC favorisent la survie des PN. Par contre, certaines de ces alarmines dans un autre contexte sont plutôt anti-inflammatoires. L'ELA et les ectosomes induisent la production de  $TGF\beta$  par les DC.

#### 4.2.2. Les DC régulent la survie et l'activation des PN

Comme décrit ci-dessus, un certain nombre de travaux ont décrit les effets des PN sur les DC. Par contre, l'interaction inverse est peu décrite dans la littérature.

Dans ses travaux, van Gisbergen a décrit l'importance de l'expression des protéines Mac-1 et CEACAM1 sur les PN pour assurer un contact efficace avec les DC et la modulation de leur maturation (van Gisbergen et al., 2005b). Par contre, du côté des PN, la liaison de ces protéines peut moduler leur survie (Singer et al., 2005; Yan et al., 2004), retardant leur apoptose.

Dans une étude récente qui complète ces données, la co-culture de PN avec des slan-DC induit une boucle de rétro-activation qui prolonge la survie des deux cellules mais serait indépendante du contact cellulaire (Micheletti et al., 2013).

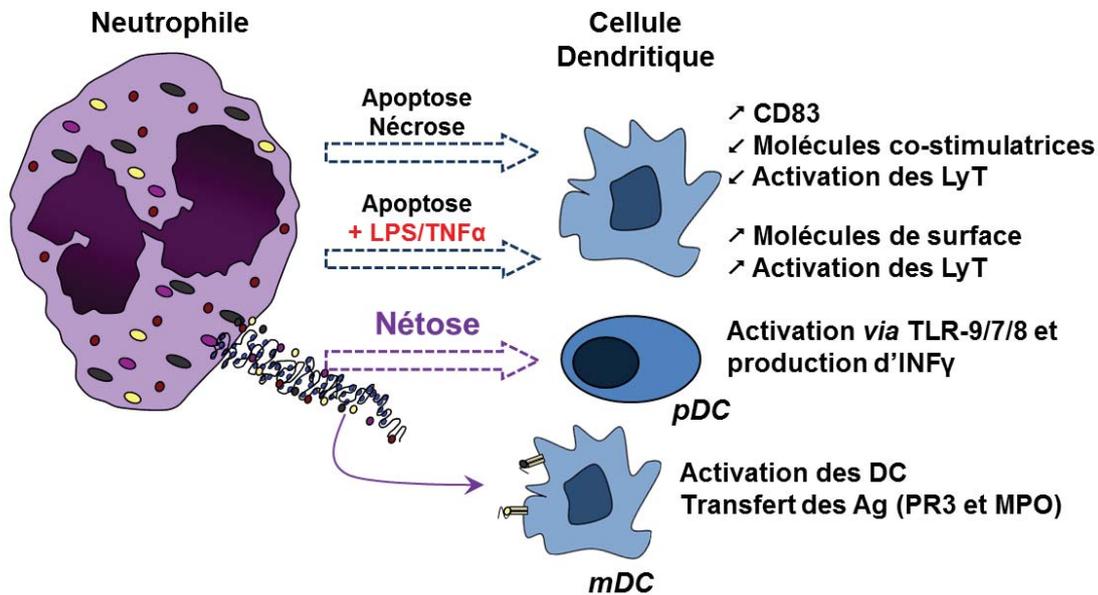
En ce qui concerne l'activation des PN par des DC, Tsuda et al., montrent que des PN mis en contact avec des pDC et des mDC augmentent leur expression de CD50, CD63 et CD64 et libèrent de l'ELA et de la MPO (Tsuda et al., 2007). Les DC peuvent activer les PN directement car des associations cellulaires ont été visualisées. Ce contact cellulaire est important car la culture de PN avec des surnageants de pDC ou mDC ne reproduit pas ces effets activateurs. Ils suggèrent, également l'implication de la molécule DC-SING dans cette interaction cellulaire.

#### 4.3. L'état des PN peut influencer la modulation des DC

Pour évaluer l'impact des PN sur l'activation des DC, il est essentiel de déterminer s'ils sont engagés dans un processus d'activation ou de mort cellulaire (apoptose, nécrose ou NETose). Ce paramètre est important car les PN sont rapidement apoptotiques dans les foyers inflammatoires (comme décrit dans le chapitre PN ci-dessus). Dans les paragraphes précédents, les données concernaient les PN activés non engagés dans un programme de mort cellulaire. Ce paragraphe abordera les effets des PN sur les DC selon ce dernier paramètre. Figure 41

Plusieurs études ont démontré que le contact de macrophages avec des **PN apoptotiques** conduisait à une réponse anti-inflammatoire puissante (Majai et al., 2010). En effet, les DC sont capables de phagocyter des PN apoptotiques et nécrotiques (Clayton et al., 2003), ce qui se traduit par l'expression de CD83 et HLA-DR, une diminution des molécules de co-stimulation CD86, CD80 et CD40 et une

diminution de la capacité de ces DC à activer les LyT. Par contre, la présence d'un *stimulus* activateur de la DC (TNF $\alpha$  ou LPS) pendant l'ingestion de PN apoptotiques, renverse partiellement ces effets régulateurs et cette réversion n'est pas observée si les PN sont nécrotiques (Majai et al., 2010).



**Figure 41. Etat des PN module de manière différentielle l'activation des DC.** Les PN apoptotiques et nécrotiques induisent l'expression de CD83 à la surface des DC mais pas celle de molécules de co-stimulation, inhibant ainsi la capacité des DC à activer les LyT. Cet effet est inversé quand les DC phagocytent des PN apoptotiques en présence d'un *stimulus* pro-inflammatoire (LPS, TNF $\alpha$ ). Les NETs libérés pendant le processus de NETose exposent des complexes ADN/protéines qui sont immunogènes et activent les pDC, c'est le cas des complexes ADN/LL-37 dans le LES et le psoriasis. Dans les vascularites, les NETs peuvent transférer des auto-Ag aux mDC et induire l'activation de ces cellules.

La **NETose** (introduite dans le chapitre 2) a été initialement décrite comme un autre type de mort cellulaire des PN caractérisée par la libération de NETs (Brinkmann et al., 2004). Actuellement, la NETose est plutôt considérée comme un état d'activation particulier des PN et non comme un état de mort cellulaire. Plusieurs des médiateurs solubles décrits dans les paragraphes précédents sont présents sur ces NETs (LF, ELA, CATG, MPO, entre autres); les NETs représentent à eux seul un mécanisme original d'exposition de ces protéines. Par exemple, HMGB1 est une alarmine capable d'attirer et activer les DC (Messmer et al., 2004; Yang et al., 2007). Dans les PN, HMGB1 est présente dans des vésicules cytoplasmiques et dans le noyau mais elle n'est pas libérée par dégranulation ou nécrose (Rovere-Querini et al., 2004); la

présence de cette molécule modulatrice des DC à la surface des NETs est donc essentielle pour l'exposer aux cellules du système immunitaire (Garcia-Romo et al., 2011).

#### 4.3.1. NETs et pDC

La modulation de la réponse immunitaire par les NETs a été principalement décrite au cours des maladies auto-immunes, car les protéines liées aux NETs sont de potentielles cibles d'auto-Ac (PR3, MPO, Histones). De plus, les complexes ADN/protéines des NETs ont la capacité d'activer les pDC, et ainsi la production d'INF $\alpha$ , signature de certaines pathologies inflammatoires chroniques (de Chaisemartin et al., 2013; Knight et al., 2012). Au cours du psoriasis, il a été montré que l'ADN du Soi devient immunogène quand il forme des complexes avec des protéines du PN comme LL37, SLPI ou l'ELA ; ces complexes, en particulier à la surface des NETs, auront la capacité d'activer les pDC (Lande et al., 2007; Skrzeczynska-Moncznik et al., 2012). De la même manière, ce complexe ADN/LL37 est impliqué au cours du LES en activant également les pDC par la voie du TLR9, déclenchant la production d'INF $\alpha$  (Garcia-Romo et al., 2011; Lande et al., 2011); cela conduit à l'activation des LyB qui produisent des auto-anticorps contre ces deux composants. Ces complexes immuns activent eux-mêmes les PN, aboutissant ainsi à une boucle d'amplification du phénomène au cœur de la pathogénie du LES.

L'activation des pDC par les NETs, principalement par le complexe ADN/LL-37, a également été étudiée chez les souris diabétiques de type 1 (Diana et al., 2013). Une infiltration précoce du pancréas de ces souris par des LyB, des pDC et des PN, ainsi que la présence de NETs ont été observées *in situ*. Il est proposé que la mort des cellules- $\beta$  du pancréas pourrait déclencher la sécrétion d'IgG spécifiques de l'ADN double brin par ces LyB ; ces IgG, formant des complexes immuns, activeraient les PN *via* les Fc $\gamma$ R, amenant à la libération de CRAMP (homologue murin du LL-37) et des NETs. Ce sont les complexes anti-ADN/ADN et ADN/CRAMP qui activeraient les pDC dans ce modèle de diabète auto-immun.

#### 4.3.2. NETs et DC myéloïdes

Dans le cas des vascularites à ANCA, le rôle de NETs n'implique pas les pDC mais plutôt les DC myéloïdes (Sangaletti et al., 2012). Les deux protéines-cibles des

auto-AC dans ces maladies, la PR3 et la MPO, sont associées aux NETs avec leurs structure et fonction préservées. Le travail de Sangaletti et *al.*, *in vivo* chez la souris, propose que le rôle des NET dans la physiopathologie des vascularites à ANCA passe par l'activation de mDC et le transfert des auto-Ag qui y sont associés. Ces hypothèses sont confortées par l'observation de lésions cutanées chez des patients au cours des vascularites, montrant que les mDC contiennent de la MPO et qu'elles interagissent directement avec des NETs.

#### **4.4. Un trio cellulaire : la communication entre les DC et les PN peut moduler la réponse lymphocytaire**

Les différents signaux qui vont moduler la maturation des DC vont aussi influencer la polarisation des LyT CD4<sup>+</sup> qui peuvent devenir principalement des cellules Th1, Th2, Th17 ou Treg (Kalinski et al., 1999).

L'importance des PN dans le développement de la réponse adaptative est mise en évidence par les travaux de Park et *al.* Ces auteurs ont observé une accumulation de mDC dans les poumons de patients neutropéniques atteints d'aspergillose invasive et chez des souris présentant une neutropénie induite expérimentalement et infectées par *A. fumigatus* (Park et al., 2010). En effet, au cours de cette infection pulmonaire, c'est le contact des PN avec les DC qui induit la maturation de ces dernières et permet leur migration vers les ganglions lymphoïdes et la poursuite de la réponse adaptative (Park et al., 2012).

La présence de PN a été impliquée dans la réponse efficace des LyT contre *C. albicans*, *L. pneumophila* et *H. pylori* (Ismail et al., 2003; Romani et al., 1997; Tateda et al., 2001) ; leur rôle dans la modulation de la polarisation de la réponse lymphocytaire T par l'intermédiaire des DC semble plus pertinent que *via* une interaction directe avec les LyT (Banchereau et al., 2000). C'est effectivement au cours des infections que l'influence des PN sur la polarisation des LyT par les DC a été la mieux observée. Lors de l'exposition à *T. gondii*, *L. major* et *M. tuberculosis*, les PN activent les DC et induisent une réponse Th1 (Bennouna et al., 2003; Blomgran and Ernst, 2011; Charmoy et al., 2010). Cette polarisation Th1 est aussi favorisée pendant la maturation des DC par les contacts cellulaires *entre* Mac-1/CEACAM et DC-SIGN (van Gisbergen et al., 2005b; van Gisbergen et al., 2005c). De plus, l'administration exogène

d'alarmines comme les  $\alpha$ -défensines, cathelicidines, LF ou HMGB1, en même temps que l'Ag va promouvoir une réponse spécifique de LyT Th1 (Yang et al., 2009).

D'autre part, il a été décrit que l'ELA des PN induisait la production de TGF $\beta$ 1 par les DC *in vitro* (Maffia et al., 2007) ; ces DC productrices de TGF $\beta$ 1, vont promouvoir la production de Treg CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Tateosian et al., 2011).

De manière intéressante, les PN ont aussi la capacité de transférer des Ag aux DC qui vont les présenter *via* les molécules CMH et induire la réponse lymphocytaire. Albert et al., ont montré que les DC humaines peuvent internaliser des Ag après la phagocytose de PN apoptotiques, les présenter par le CMH-I et ainsi activer les LyT CD8<sup>+</sup> (Albert et al., 1998). Ceci a été confirmé dans un modèle d'infection avec *C. albicans* (Megiovanni et al., 2006) ; la co-culture de DC avec des PN prétraités avec cette levure induit la réponse des LyT autologues. Ce phénomène implique soit la phagocytose des PN apoptotiques, soit le transfert d'Ag par contact cellulaire entre les DC et les PN infectés. De la même manière, au cours de l'infection avec *M. tuberculosis*, les DC peuvent internaliser des Ag déjà pris en charge par les PN infectés ou bien les prendre en charge elles-mêmes directement (Morel et al., 2008). Ce mécanisme de transfert d'Ag n'est pas encore bien connu. Les PN ont aussi la capacité de capturer des microorganismes, comme *Mycobacterium bovis*, dans le tissu périphérique et les transporter vers les organes lymphoïdes, où ils rencontrent les DC pour le transfert des Ag (Abadie et al., 2005). Cependant, il a aussi été montré que dans un autre contexte infectieux, la phagocytose des PN infectés par *L. major* par les DC aura un impact plutôt régulateur dans l'activation des lymphocytes (Ribeiro-Gomes et al., 2012).

Enfin, comme mentionné précédemment, au cours des vascularites auto-immunes à ANCA, les PN en NETose interagissent avec des DC myéloïdes, ce qui permet le transfert d'auto-Ag (PR3/MPO) aux DC, leur présentation aux LyT et, ainsi, l'amplification de la réponse auto-immune (Sangaletti et al., 2012).

**Au total**, les interactions entre les PN et les DC sont variées et nombreuses. En particulier, les PN peuvent moduler la maturation des DC, sur un mode activateur ou bien régulateur, selon l'environnement. Quelques travaux récents concernant en particulier la physiopathologie des maladies auto-immunes, ont suggéré que les NETs

pourraient moduler les fonctions des pDC et des mDC, et de ce fait, l'activation des LyT auto-réactifs.

*Objectif du travail*



L'objectif de ce travail a consisté à mieux comprendre le **rôle des PN dans la modulation fonctionnelle des DC**, afin de documenter les liens majeurs qui existent entre immunité innée et immunité adaptative.

Parmi les nombreuses fonctions que possède le PN, nous avons choisi d'explorer le rôle de la NETose, c'est à dire la production de « **Neutrophil Extracellular Traps** » (NETs). Lors de l'activation des PN, la libération rapide de NETs permet l'exposition extracellulaire de nombreux médiateurs issus des granulations, du cytoplasme ou du noyau sur un squelette relativement rigide de chromatine. L'ensemble de ces composants peuvent réagir avec les cellules et tissus environnants, en particulier avec les DC du site inflammatoire, où ces deux types cellulaires coexistent.

Des travaux précédents de notre équipe avaient montré que certains *Escherichia coli* entéropathogènes (DAEC Afa/Dr) étaient inducteurs de NETose. Ces bactéries étaient aussi détruites par les NETs grâce à l'effet microbicide attendu, mais nous avons démontré que, lors de la NETose, les protéases des NETs étaient également délétères pour les cellules épithéliales digestives environnantes. Ces premiers travaux nous ont ainsi permis de faire l'hypothèse de l'action des nombreux composants des NETs, en particulier des protéases, sur les cellules du site inflammatoire.

D'autre part, certains travaux de la littérature, quasiment limités au contexte de la physiopathologie du lupus, ont montré que les complexes ADN/protéines des NETs, en se fixant au TLR9, induisaient l'activation des DC plasmacytoïdes (pDC) et la production d'INF $\alpha$ . De plus, certaines protéines présentes sur les NETs sont connues pour moduler les DC, comme la LF qui stimule la maturation, l'ELA qui induit la production de TGF $\beta$  ou encore HMGB1 et l' $\alpha$ -défensine qui les recrutent.

Ce **travail de thèse a été structuré en deux parties** : 1) la production d'un outil biologique constitué par des NETs isolés, 2) l'analyse du mécanisme d'action de ces NETs isolés sur des DC humaines.

L'objectif de la **première partie** a consisté en la mise au point d'un protocole standardisé de production, isolement, caractérisation et quantification de NETs issus de PN humains sanguins. La séparation des filaments de NETs des PN est une étape primordiale dans ce projet car les PN *per se* ont la capacité de moduler les DC.

Dans la **deuxième partie** du travail de thèse, les effets de ces NETs isolés ont été étudiés sur des DC dérivées de monocytes sanguins humains (moDC). Nous avons

## *Objectif du travail*

---

étudié en parallèle l'effet direct des NETs sur les moDC, ainsi que leur effet modulateur de la maturation induite par le LPS (phénotype, production de cytokines, migration). Enfin, nous avons déterminé les conséquences de cette présence de NETs sur la capacité des moDC matures à activer des LyT CD4<sup>+</sup> naïfs et à polariser leur réponse.

# *Méthodes*



### **5.1 Isolement des polynucléaires neutrophiles sanguins humains (PN)**

Les PN sont obtenus à partir de poches de sang de donneurs sains fournies par l'Etablissement Français du Sang (EFS - Rungis, France). Dans un premier temps, les leucocytes sont séparés par sédimentation sur un milieu de séparation contenant 5% Dextran T500® (Pharmacia, Uppsala, Suède) dans du sérum physiologique à 0.9% de NaCl. Les PN sont ensuite séparés des cellules mononucléées par centrifugation sur un gradient de Ficoll (Eurobio, Les Ulis, France). Les globules rouges sont éliminés par lyse hypotonique et les PN resuspendus dans du milieu HBSS (Hank's buffered salt solution) (Gibco Life Technologies, Saint Aubin, France) contenant 0.05% de sérum de veau foetal (SVF) (PAA, Les Mureaux, France) et 10 mM d'Hépès (Gibco).

### **5.2 Libération de NETs en réponse au PMA ou à l'ionophore calcique A23187**

Les PN sont immédiatement déposés dans des microplaques de culture de 96 puits à fond plat, noires ( $2 \times 10^5$  cellules/puits), en présence de 5  $\mu$ M de Sytox Green (Invitrogen, Saint Aubin, France), marqueur fluorescent de l'ADN extracellulaire. Les PN sont alors stimulés avec des concentrations croissantes de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) (2 à 250 nM) (Sigma Aldrich, Lyon, France) ou de l'ionophore de calcium A23187 (0.2  $\mu$ M à 25  $\mu$ M) (EMD chemicals, San Diego, CA) à 37°C, sous 5% de CO<sub>2</sub> et à l'obscurité. L'ADN libéré est quantifié par mesure de la fluorescence du Sytox à 0, 60, 120, 180 et 240 minutes, grâce à un lecteur de fluorescence pour microplaques (Tristar™ LB941 BERTHOLD, Bad Wildbad, Germany) (longueur d'onde d'excitation : 485 nm et longueur d'onde d'émission : 527 nm). Tous les échantillons sont traités en double. Ces expériences ont permis de déterminer la concentration optimale de chaque stimulant, ainsi que le temps de libération maximale de NETs.

### **5.3 Observation des NETs par immunofluorescence**

Les PN fraîchement isolés sont distribués sur des lamelles de verre recouvertes de polylysine ( $2 \times 10^5$  cellules/puits) puis traités avec 50 nM de PMA ou 5  $\mu$ M d'A23187 à 37°C. Après 3 heures d'activation, les cellules sont fixées à température ambiante à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) (Electron Microscopy Sciences, Hartfield, PA) à 4% en PBS (phosphate-buffered saline) (Gibco Life Technologies). Les échantillons sont lavés avec du PBS, bloqués avec 2% de BSA (bovine serum albumin)

(PAA) et incubés avec des anticorps anti-ELA, anti-LF (Sigma Aldrich), anti-histone 3 (H3) (EMD chemicals) ou anti-H3cit (H3 citrullinée ) (clone ab5103, Abcam, Cambridge, UK) pendant 30 min à température ambiante, puis incubés pendant 30 minutes avec un anticorps secondaire approprié couplé à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Karlsruhe, Germany). Des anticorps contrôles isotopiques sont utilisés en parallèle. Après lavage des échantillons, les lamelles sont montées dans un milieu contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) (Southern Biotech, Birmingham, USA) pour marquer l'ADN. Les cellules sont observées grâce à un microscope inversé à épifluorescence (AxioObserver Z1\_Colibri, Zeiss, Germany) équipé d'une caméra MRm CCD. Toutes les images sont acquises avec un objectif à immersion Plan-Apochromat 63X / 1.4 NO, utilisant deux diodes (365 nm and 470 nm) pour l'excitation et deux filtres passe-bande (445/450 nm and 530/550 nm) pour analyser les fluorescences bleue et verte, respectivement.

### **5.4 Comparaisons des différentes nucléases pour la récupération des NETs**

Dans un premier temps, 4µg de λDNA purifié (Invitrogen) ont été traités avec 4 U/mL de DNase I (Sigma Aldrich), 4 U/mL de MNase (New England BioLabs, France), ou 4 U/mL d'Alul (New England BioLabs) pendant 20min à 37°C. Les échantillons récupérés ont migré dans un gel d'agarose 0.8% v/v, préparé dans du tampon Tris-acétate-EDTA et contenant 0.5 µg/ml de bromure d'ethidium (BET), à 100V pendant 30 minutes. Les fragments d'ADN sont observés par exposition dans le trans-illuminateur UV MiniBIS-Pro (DNR Bio-imaging Systems).

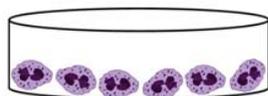
Ensuite, les PN activés avec l'A23187 (5µM), 3 h à 37°C, dans des plaques de culture à 12 puits (1,5x10<sup>6</sup> PN/puits), ont été traités avec des concentrations croissantes d'Alul, DNaseI, ou MNase (0, 0.8, 4, et 20 U/mL) pendant 20 min à 37°C. Les surnageants récupérés de chaque puits ont été traités ensuite comme décrit ci-dessus, pour les analyser par électrophorèse en gel d'agarose.

### **5.5 Isolement des NETs**

Les PN sont déposés en plaque de culture à 12 puits (1.5x10<sup>6</sup> cellules/puits) et activés avec 50 nM de PMA ou 5 µM d'A23187 pendant 3 heures à 37°C, sous 5% de CO<sub>2</sub>. Après deux lavages doux avec 1 mL de PBS, chaque puits est incubé pendant 20

min à 37°C avec 350 µL de HBSS contenant 4 U/mL de l'enzyme de restriction Alu I. Le surnageant de chaque puits est récupéré et centrifugé 5 minutes à 300 xg, 4°C, pour éliminer les cellules et les débris cellulaires. Les surnageants riches en NETs sont alors caractérisés (concentration en ADN et en protéines). Figure 42

### ***Isolement des PN***



#### **Dextran/Ficoll**

Mise en culture en HBSS/SVF/Hépès

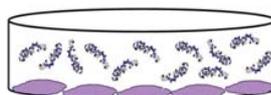
### ***Activation de la nétose***



Ionophore de calcium **A23187**

3H à 37°C/5%CO<sub>2</sub>

### ***Isolement des NETs***



Traitement avec **Alu I**

20min à 37°C/5%CO<sub>2</sub>

### ***Récupération des NETs et caractérisation***



Quantification

de l'ADN et des protéines

Figure 42. Protocole d'isolement des NETs

## **5.6 Observation et quantification de l'ADN des NETs isolés**

La taille des fragments d'ADN obtenus est estimée après électrophorèse des échantillons en gel d'agarose comme décrit ci-dessus.

L'ADN est quantifié dans les échantillons de NETs à l'aide de Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Molecular Probes), colorant ayant une forte affinité pour l'ADN double brin (ADNdb) en solution. La calibration est réalisée grâce à des échantillons étalons entre 30 and 1000 ng/mL d'ADNdb. La fluorescence des échantillons est

quantifiée à l'aide d'un lecteur de microplaques à fluorescence (Tristar™ LB941).

### **5.7. Observation et quantification des protéines totales et de certaines protéines majeures des NETs (H3, histone 3 citrullinée et LF)**

Les protéines totales des NETs sont quantifiées par une technique utilisant l'acide bicinchoninique (Pierce, Rockford, IL, USA). L'analyse qualitative de la variété des protéines est effectuée par SDS-PAGE. Pour cela, les protéines des NETs (30 µg de protéines totales) sont séparées dans des conditions dénaturantes et réductrices par migration électrophorétique sur un gel à 15% d'acrylamide. Après fixation par une solution éthanol/acide acétique, les protéines sont révélées par une coloration au nitrate d'argent (protocole de l'IFR 141, IPSIT «Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique» plateforme de transcriptomique et protéomique).

Deux protéines majeures des NETs sont dosées par western blot quantitatif (Urban et al., 2009). Dans des puits différents d'un même gel sont chargés 30 µg de protéines totales de NETs et, pour l'étalonnage, des concentrations croissantes d'H3 purifiée (0.5–2 ng/µL) ou de LF purifiée (0.5–2 ng/µL) (Sigma Aldrich). Après séparation électrophorétique, les protéines sont transférées sur des membranes Hybond (Amersham Biosciences, Vélizy-Villacoublay, France) pendant une nuit à 40 V, à 4°C. Les membranes sont saturées avec de la BSA, puis incubées avec des anticorps spécifiques anti-H3 et anti-LF. La fixation de ces anticorps primaires est révélée grâce à un sérum de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase de raifort (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) et visualisée par chimioluminescence grâce à l'EZ ECL (Biological Industries, Israël). Cette méthodologie a également permis de mettre en évidence l'histone 3 citrullinée.

### **5.8 Quantification de l'activité ELA des NETs isolés**

L'activité ELA des échantillons de NETs est mesurée par une méthode enzymatique utilisant un substrat de l'ELA, le Boc-Ala-Ala-Pro-Ala-pNA (Boc = t-butoxycarbonyl; pNA = para-nitroanilide) (EMD chemicals) dans un tampon phosphate 20 mM contenant 0.15 M de NaCl, 0.1 mM d'EDTA et 0.1% de PEG-8000 à pH 7,4. La solution de NETs est incubée avec le substrat de l'ELA dans une proportion de 1:10 (v/v) et la vitesse initiale de libération de pNA est suivie par la mesure de l'absorbance à 405 nm. Une gamme d'étalonnage est réalisée en parallèle avec de l'ELA purifiée de

PN humains (EMD chemicals). L'activité ELA des échantillons NETs est ainsi calculée à partir de la pente de la courbe de la vitesse de réaction, à l'aide du logiciel GraphPad®.

## 5.9 Test de reproductibilité

Pour valider la technique d'isolement proposée, un test de reproductibilité a été réalisé en utilisant des poches de sang provenant de 4 donneurs. Chaque poche a été divisée en trois parties et le protocole d'isolement des NETs a été appliqué à chaque fraction pour obtenir trois échantillons de NETs différents provenant de chaque donneur. Puis, chaque échantillon a été caractérisé en parallèle par la quantification de l'ADNdb, l'H3, la LF et l'ELA, comme décrit ci-dessus. Tous ces dosages ont également été réalisés en triple.

## 5.10 Quantification du pouvoir bactéricide des NETs isolés

Des cultures en phase de croissance exponentielle de quatre souches bactériennes sont repiquées en bouillon Luria-Bertani (LB) et incubés à 37°C pendant 18 h : la souche sauvage enteropathogène de DAEC C1845 Afa/Dr (diffusely adhering *Escherichia coli*), la souche SL1344 de *Salmonella enterica* sérotype *Typhimurium*, la souche sauvage M90T de *Shigella flexneri* et une souche de *Staphylococcus aureus* de la collection clinique du laboratoire de microbiologie de la Faculté de Pharmacie. Les bactéries sont lavées, comptées en chambre de Salumbini et ajustées à  $1 \times 10^6$  unités formant colonies par mL (UFC/mL). Les bactéries (100µL) sont incubées avec des NETs isolés à la concentration finale de 50 ng/ml d'ADN à 37°C pendant 45 min. Ces échantillons sont ensuite dilués en série, étalés sur une gélose LB et incubés durant 24 h à 37°C avant détermination du nombre d'UFC/mL. Le pouvoir bactéricide des NETs, exprimé en % de viabilité bactérienne, est déterminé à partir du nombre de bactéries récupérées après leur incubation avec des NETs par rapport au nombre récupéré après incubation dans un tampon sans NETs. En parallèle, les différentes souches bactériennes ont été traitées avec des échantillons de NETs préalablement digérés avec la DNaseI. Pour la préparation de ces échantillons, le surnageant des NETs isolés a été traité avec 20u/mL de DNase (concentration finale) pendant 20min à 37°C/CO<sub>2</sub>; la digestion de l'ADN a été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose.

### 5.11 Différenciation *in vitro* de cellules dendritiques dérivées de monocytes humains purifiés (moDC)

A partir des cellules mononucléées (PBMC) séparées préalablement par centrifugation en gradient de Ficoll (voir isolement des PN), les monocytes sont isolés par sélection positive à l'aide d'anticorps anti-CD14 couplés à des billes magnétiques (Miltenyi Biotec). Les monocytes purifiés ( $1 \times 10^6$  /ml) sont cultivés pendant 5 jours (37°C, atmosphère humide et 5 % de CO<sub>2</sub>) en milieu complet RPMI 1640/ GlutaMAX™/25mM HEPES (Gibco Invitrogen) en présence de 1% de pyruvate de sodium (Gibco Invitrogen), 10% de SVF décomplémenté, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de Streptomycine (Gibco Invitrogen), 550 U/ml de GM-CSF humain recombinant (hr) et 550 U/ml d'IL-4hr (Miltenyi Biotec). La différenciation en moDC est vérifiée par immunophénotypage et analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs suivants : DC-SIGN, CD1a, CD14, CD83 et CD86 (FACSCalibur®, Becton Dickinson). (Antonios et al., 2010) (Figure 43)

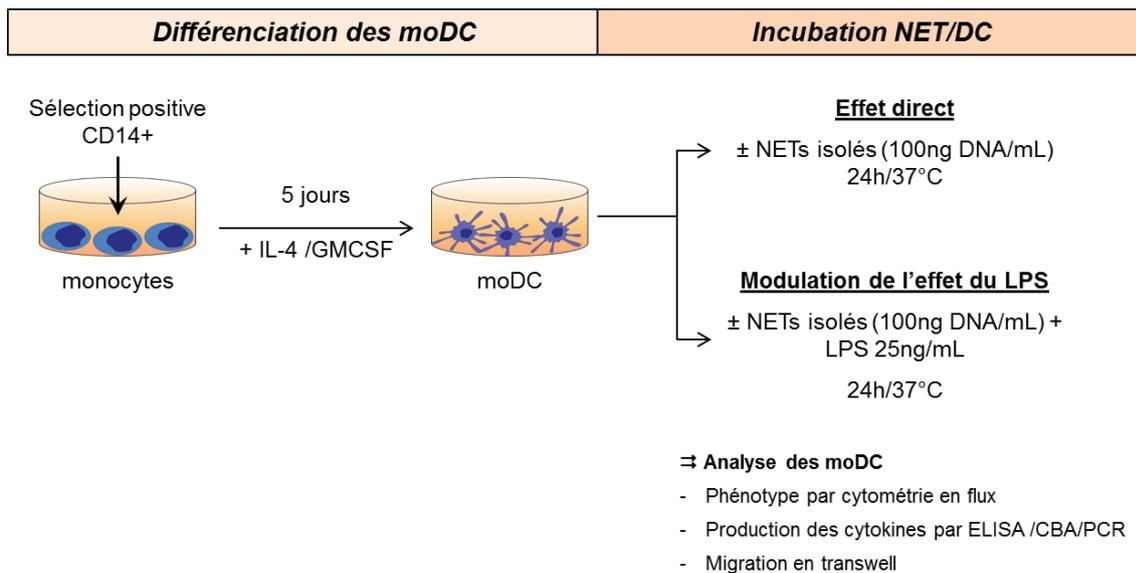


Figure 43. Différenciation, traitement par le LPS et/ou les NETs et analyse des moDC

### 5.12 Induction de la maturation des moDC et effet modulateur des NETs

Les moDC ( $1 \times 10^6$ /mL) sont prétraitées ou non avec des NETs (100 ng DNA/ mL) en milieu RPMI 1640 pendant 30 minutes avant d'ajouter ou non du LPS (25 ng/ml) en présence de SVF (10%). Une cinétique de maturation entre 2 et 24 heures est réalisée,

et le choix du temps de maturation est fonction de l'expérience (3h pour l'étude des ARNm de cytokines, 24h pour le dosage des cytokines dans le surnageant et le phénotypage membranaire).

L'effet des NETs sur la maturation des moDC est recherché par plusieurs techniques complémentaires détaillées ci-dessous, et résumées dans la figure 43.

### 5.13 Immunophénotypage des moDC après maturation

Après 24h d'activation par le LPS, l'effet des NETs sur la maturation des DC est d'abord évalué par l'analyse de leur phénotype par cytométrie en flux. Les DCs sont récupérées en PBS froid additionné de 0.5% de BSA puis incubées, pendant 20 minutes à 4°C, avec des anticorps monoclonaux spécifiques (tableau 6) conjugués à un fluorochrome ainsi qu'avec un contrôle isotypique approprié. Après deux lavages en PBS froid, les cellules sont fixées en PFA1%/PBS. La lecture est effectuée par cytométrie en flux (FACSCalibur®) à l'aide du logiciel CellQuest® (Becton Dickinson). Les résultats sont exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence corrigée (cMIF), qui correspond au rapport de la MIF pour un marquage spécifique / MIF du témoin isotypique pour ce marquage.

Tableau 6. Caractéristiques des anticorps utilisés pour le phénotypage des DC

Anticorps marqué	Référence et fournisseur	Contrôle isotypique
CD86 <sup>PE</sup>	clone 2331 FUN-1 (BD 555658)	Mouse IgG <sub>1</sub> <sup>PE</sup>
CD83 <sup>APC</sup>	clone HB15e (BD 551073)	Mouse IgG <sub>1</sub> <sup>APC</sup>
CD40 <sup>APC</sup>	clone 5C3 (BD 555591)	Mouse IgG <sub>1</sub> <sup>APC</sup>
CD80 <sup>FITC</sup>	clone L307.4 (BD 557226)	Mouse IgG <sub>1</sub> <sup>FITC</sup>
HLA DR <sup>FITC</sup>	clone L243 (BD 555811)	Mouse IgG <sub>1</sub> <sup>FITC</sup>

APC : Allophycocyanine ; FITC : isothiocyanate de fluorescéine ; PE ; phycoérythrine.; BD : BD Biosciences

### 5.14 Dosage des cytokines libérées par les moDC pendant la maturation

Après 24h d'activation par le LPS, l'effet des NETs sur la maturation des DC est également évalué par la quantification de cytokines libérées dans le surnageant de culture.

Les dosages du TNF $\alpha$ , de l'IL-6, de l'IL-8 et de l'IL-10 sont réalisés par la technique multiplex de CBA (cytometric bead array, BD Biosciences) conformément aux instructions du fabricant. Dans ce test, des microbilles de taille homogène portent des anticorps de capture dirigés contre une cytokine spécifique. Après incubation des billes avec les surnageants, les cytokines capturées sont marquées par un anticorps secondaire couplé à la phycoérythrine. Les échantillons sont analysés par cytométrie en flux (FACSCalibur) à l'aide des logiciels FACSArray CellQuest<sup>®</sup> et FCAP<sup>®</sup> (BD Biosciences). Une gamme d'étalonnage est réalisée en parallèle grâce à des cytokines purifiées de concentration connue.

Dans certaines expériences, le dosage du TNF $\alpha$  des surnageants de culture est également réalisé par ELISA (kit OptEIA, BD Biosciences). Selon les instructions du fabricant, les anticorps de capture anti-TNF $\alpha$  sont adsorbés sur les parois des puits de plaques MaxiSorp<sup>™</sup> (Nunc-Immuno) par incubation dans du tampon carbonate/bicarbonate pendant une nuit à 4°C. Après saturation des puits, les échantillons sont incubés pendant 2 h à température ambiante. Le TNF $\alpha$  capturé est marqué par un second anticorps anti-TNF $\alpha$  conjugué à la peroxydase de raifort dont l'activité est quantifiée par addition de son substrat, le 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). La réaction est arrêtée par ajout d'une solution acide et l'absorbance à 450 nm est lue sur un lecteur de plaque (Bio-Tek Instruments Inc, Winooski, VT). Une gamme d'étalonnage est réalisée en parallèle grâce à du TNF $\alpha$ rh. Les résultats sont exprimés en pg/ml. La sensibilité de la méthode est de 7,8 pg/mL

Le dosage d'IL-12p70 est réalisé par ELISA (Quantikine, R&D Systems), conformément aux instructions du fabricant. Les résultats sont exprimés en pg/mL. La sensibilité de la méthode est de 5 pg/ml.

Le dosage de l'IL-23 est réalisé par ELISA en utilisant human le kit IL-23 ready-SET-Go (e-biosciences, San Diego, CA).

### **5.15 Test de dégradation du TNF $\alpha$ par les NETs**

Une quantité fixe de TNF $\alpha$  : (rhTNF $\alpha$  ou surnageants des DC activées par le LPS) est incubée pendant 24 heures à 37°C avec des concentrations croissantes de NETs (0, 10, 30, 100 or 300 ng/mL of DNA) dans un volume final de 40 $\mu$ L. Puis le TNF $\alpha$  est quantifié dans chaque échantillon par la méthode ELISA décrite au-dessus.

### 5.16 Analyse des transcrits de cytokines par PCR quantitative (qPCR) dans les moDC

Une cinétique de 8 heures a été réalisée pour quantifier les ARNm de cytokines, afin d'évaluer l'effet des NETs sur l'activation des DC. Les DC dans les différentes conditions (DC non traitées, DC/LPS et DC/LPS/NETs) ont été récupérées au début (T=0) et à 2, 4 et 8 heures de stimulation.

L'ARN total des moDC est extrait à l'aide de TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen). Les ARN sont séparés de l'ADN et des protéines par addition de chloroforme, puis récupérés par précipitation en isopropanol, selon le protocole indiqué par le fabricant. Les ARN sont dosés par spectrophotométrie à 260 nm, la densité optique à 280 nm et à 230 nm donnant des indices de contamination. Le premier brin d'ADNc est synthétisé à partir d'1µg d'ARN total avec des amorces oligo (dT) (MWG Biotech), 2U/µL d'inhibiteurs d'ARNases et 0,2U/µL de la transcriptase reverse AMV (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) en suivant le protocole du fournisseur de l'enzyme.

La PCR en temps réel est réalisée en utilisant la technique SYBR Green sur un thermocycleur "rapide", le LightCycler (Roche Diagnostics, Meylan, France). Chaque milieu réactionnel de 10 µL est constitué de : 4 µL d'une dilution 1:50 de cDNA, amorces sens et anti-sens (0,5 µM), préparation de Sso Advanced Supermix (Biorad, Marnes la coquette, France). Après activation de l'ADN polymérase à 95°C pendant 30 secondes, la réaction PCR est réalisée sur 44 cycles de 5 secondes à 95°C et 5 secondes à 60°C ; la lecture du signal SYBR Green est faite à la fin de chaque cycle. A la fin de la réaction, la dénaturation des amplicons en ADNdb est effectuée pour connaître leur homogénéité, indicatrice de la spécificité de la réaction d'amplification. Cette spécificité est aussi évaluée par des analyses des produits de PCR sur gel d'agarose. L'efficacité d'amplification (E) pour chaque transcrite est calculée à partir de la pente des amplifications d'une gamme de dilutions en série de 7 en 7 de l'ADNc.

La quantité relative des ARNm d'intérêt est réalisée à l'aide du logiciel Biorad CFX Manager. Les données sont analysées en utilisant la méthode du delta-delta Cq. Les résultats sont exprimés en proportion normalisée (Rn), calculée de la manière suivante :

$$Rn = (1 + E)^{-\Delta\Delta Cq}$$

E= efficacité d'amplification

Cq = cycle auquel le signal croise le seuil du bruit de fond (calculé automatiquement)

$$\Delta\Delta Cq = (Cq_{\text{gène cible}} - Cq_{\text{gène de référence}})_{\text{échantillon traité}} - (Cq_{\text{gène cible}} - Cq_{\text{gène de référence}})_{\text{échantillon non traité}}$$

Les amorces sens et anti-sens pour chaque transcrite d'intérêt sont choisies sur des exons contigus pour pouvoir différencier, selon la taille des produits, l'amplification des ARNm de celle des ADN génomiques. Les séquences des amorces utilisées sont indiquées dans le tableau 7. Les transcrits de référence utilisés pour calibrer l'abondance relative des ARNm d'intérêt sont ceux de la GAPDH et de la  $\beta$ -actine.

Tableau 7. Liste des amorces utilisées pour l'analyse des transcrits par PCR

Gène	Amorce Sens	Amorce Anti-sens	Localisation (S)	Localisation (AS)
IL-1 $\beta$	ACA GAC CTT CCA GGA GAA TG	GCA GTT CAG TGA TCG TACAG	333-352 (Ex.4)	459-440 (Ex.5)
IL-6	TCA ATG AGG AGA CTT GCC TG	GAT GAG TTG TCA TGT CCT GC	433-452 (Ex.3-4)	674-693 (Ex.5)
IL-8	TCT CTT GGC AGC CTT CCA TGA	TGG GGT GGA AAG GTT TGG AG	177-193 (Ex.1)	273-292 (Ex.2)
IL-10	GTG ATG CCC CAA GCT GAG A	CAC GGC CTT GCT CTT GTT TT	339-357 (Ex.3)	476-457 (Ex.4)
IL-23A	GTTCCCATATCCAGTGTGG	TCCTTTGCAAGCAGAACTGA	368-387 (Ex.2)	443-424 (Ex.3)
TNF $\alpha$	TCT TCT CGA ACC CCG AGT GA	CCT CTG ATG GCA CCA CCA G	407-426 (Ex.3)	557-539 (Ex.4)
GAPDH	CAG CCT CAA GAT CAT CAG CA	TGT GGT CAT GAG TCC TTC CA	624-643 (Ex 4-5)	729-710 (Ex. 6-7)
BACT	GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA	GCA CAC GCA GCT CAT TGT AG	271-290 (Ex.3)	372-354 (Ex. 4)

### 5.17 Etude de la translocation de la sous-unité NF $\kappa$ B p65 dans le noyau au cours de la maturation des moDC

Afin d'approfondir l'étude de l'implication de la voie de NF $\kappa$ B, la visualisation de sa translocation est réalisée sur lame par immunofluorescence. Les moDC ( $2 \times 10^5$ ) sont déposées sur des lamelles, incubées ou non avec des NETs (100ng/mL d'ADN) pendant 30 min, puis activées par 25ng/mL de LPS 45 min à 37°C / 5%CO<sub>2</sub>. Les cellules sont ensuite lavées, puis fixées avec du PFA 3% pendant 15 min. Après 3 lavages en PBS, elles sont perméabilisées par du Triton X100 à 0.1% pendant 5 minutes. Les cellules sont alors marquées avec un anticorps anti-p65 total en PBS-

BSA 2% pendant 25 min. Après 3 lavages, un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué à l'Alexa 546 est ajouté pendant 25 min. Les cellules sont lavées 3 fois en PBS, puis les lamelles sont montées sur lames avec du milieu de montage contenant du DAPI (Southernbiotech), et observées immédiatement au microscope à épifluorescence (Zeiss Aristoplan).

### 5.18 Test de prolifération des LyT CD4<sup>+</sup> en réponse aux moDC

La prolifération de LyT allogéniques est réalisée par co-incubation de moDC d'un donneur sain avec la fraction CD14<sup>neg</sup> de PBMC allogéniques isolées auparavant du sang d'un autre donneur ; les PBMC CD14<sup>neg</sup> autologues servent de témoin. Les PBMC sont marquées avec du carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester (2,5 µM) (CFSE, Molecular Probes), puis lavées et déposées dans des plaques de 96 puits (1x10<sup>5</sup> PBMC/ puits) en présence de moDC (proportions moDC : PBMC 1:3 et 1:9). Des PBMC non stimulées et des PBMC stimulées par 10 µg/mL de phytohémagglutinine A (PHA) sont utilisées comme témoins négatif et positif d'activation cellulaire, respectivement.

Après 6 jours de co-culture, les cellules sont recueillies dans du PBS froid et marquées avec un Ac anti-CD4 conjugué à la PE (BD bioscience) ou avec un anticorps contrôle isotypique. Pour l'analyse cytométrique, les cellules sont mises dans du PBS contenant 0,6 µg/mL d'iodure de propidium (PI). Les cellules CD4<sup>+</sup> ayant proliféré correspondent aux cellules CFSE<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> PI<sup>neg</sup>. Figure 44

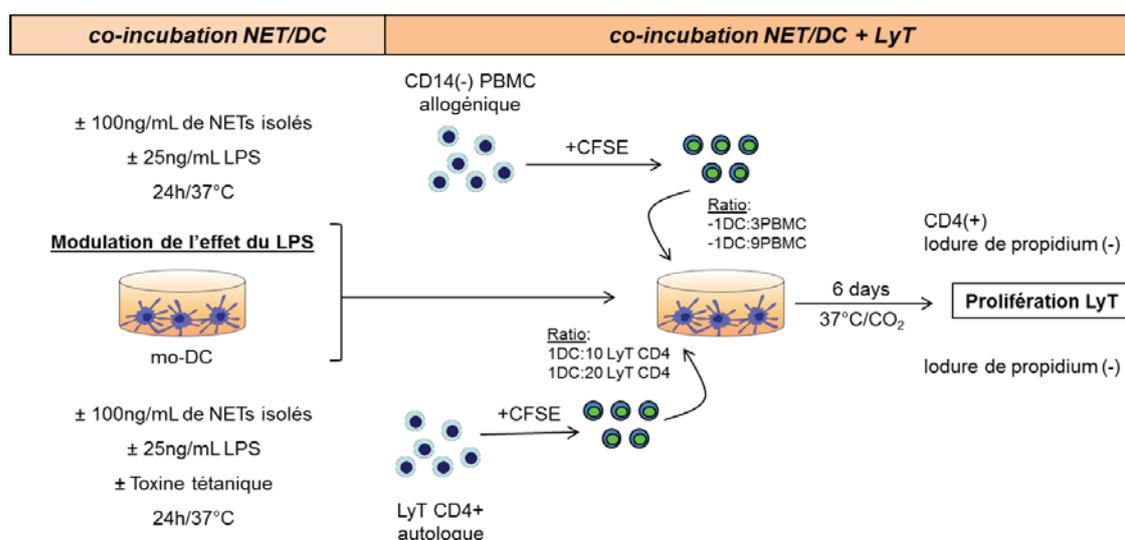


Figure 44. Etude de la capacité des moDC à induire la prolifération de LyT

Pour étudier la prolifération de LyT Ag spécifique des co-incubations de moDC avec des LyT CD4<sup>+</sup> du même donneur (autologue) sont réalisées. Les LyT CD4<sup>+</sup> sont isolés par sélection positive à l'aide d'anticorps anti-CD4 couplés à des billes magnétiques (Miltenyi Biotec) à partir de PBMC. Dans cette expérience les DC sont préalablement chargées avec l'Ag, la toxine tétanique (0,2 µg/mL), au cours de la maturation. La co-culture moDC / LyT (proportions moDC : PBMC 1:10 et 1:20) est faite suivant la méthodologie décrite ci-dessus. Figure 44

### **5.19 Analyse des transcrits des gènes effecteurs et tolérogènes par PCR quantitative (qPCR) dans les moDC**

L'ARN total est extrait des moDC incubées dans différentes conditions (DC non traitées, DC/NETs, DC/LPS et DC/LPS/NETs) en utilisant le RNeasy mini kit et le robot Qiacube (Qiagen, Courtaboeuf, France); les ADNc sont obtenus et l'expression des ARNm est évaluée par qPCR dans le système 7900HT real-time PCR Applied Biosystems) utilisant le kit et les réactifs Taqman gene expression, selon les indications du fournisseur (Applied Biosystems). L'expression des gènes suivants a été évaluée : *GILZ* (Hs00608272\_m1), *C1QA* (Hs00381122\_m1), *CATC* (Hs00175188\_m1), *MX1* (Hs00895608\_m1), and *NMES1* (Hs00260902\_m1). Les résultats de chaque transcrite ont été interprétés par comparaison avec le transcrite endogène control β-actine (Hs99999903\_m1). La quantité relative de chaque gène a été calculée par rapport à l'échantillon contrôle (DC non traitées) utilisant la méthode delta delta Cq.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr. Laurent Mascarell et Claire Gueguen (Laboratoire Stallergènes, Antony)

### **5.20 Polarisation des LyT CD4<sup>+</sup> naïfs en réponse aux moDC**

Les LyT CD4<sup>+</sup> naïfs sont isolés à partir des PBMC par sélection négative à l'aide d'anticorps couplés à des billes magnétiques (MACS naïve CD4 isolation kit Miltenyi Biotec) et leur pureté, évaluée par l'expression de CD3, CD4 et CD45RA, doit être supérieure à 95%. Les moDC, activées la veille en présence de NETs ou non, sont lavées et sont mises en co-culture avec des LyT CD4<sup>+</sup> naïfs allogéniques (1x10<sup>6</sup> LyT, proportion moDC : LyT 1 :10) pendant 5 jours en plaque de 24 puits. Les dosages d'IFN-γ, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 et IL-17A dans les surnageants sont effectués par des multiplex en billes (Merck Millipore) et la technologie Luminex (Luminex).

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Laurent Mascarell et Claire Gueguen (Laboratoire Stallergènes, Antony)



*Article 1*



L'objectif de ce premier travail a été de développer un protocole permettant la production, l'isolement et la caractérisation de NETs à partir de PN sanguins frais humains. Nous nous sommes inspirés du modèle décrit par le groupe de Zychlinsky pour l'isolement des protéines de NETs, que nous avons adapté pour conserver l'armature d'ADN/histones ainsi que les protéines qui y sont associées, tout en maintenant leur activité biologique.

Les PN isolés du sang de donneurs sains ont été activés par l'ionophore de calcium A23187, fort inducteur de NETose. Après une série de lavages pour éliminer les médiateurs solubles libérés par les PN, les NETs ont été traités avec l'enzyme de restriction Alu I qui permet de les séparer du corps cellulaire et ainsi les récupérer dans le surnageant.

La présence d'ADN et de protéines issues des PN a été ensuite recherchée dans les surnageants. L'ADN a été visualisé après électrophorèse en gel d'agarose et révélation à l'aide de BET. Les protéines ont été mises en évidence par électrophorèse en gel d'acrylamide puis révélation à l'aide de nitrate d'argent. La présence de protéines spécifiques telles que la LF et les histones a été démontrée par western blot (WB). La mise en évidence d'H3cit dans le surnageant de NETs isolés signe le processus de NETose. La coexistence d'ADN et de protéines nucléaires et granulaires permet donc de confirmer la présence de NETs de grande taille dans ces échantillons.

Différents composants des NETs ont ensuite été quantifiés. L'ADN double brin a été dosé par la technique de fluorescence Pico-GREEN ; l'activité de l'ELA a été quantifiée par une méthode enzymatique, la LF et l'H3 ont été dosées par WB quantitatif. La comparaison des NETs isolés issus de 10 donneurs sains a mis en évidence une hétérogénéité interindividuelle quant à leur composition, dont il faudra tenir compte dans l'utilisation ultérieure potentielle de ces échantillons. La reproductibilité de la méthode a été vérifiée en réalisant trois isollements en parallèle chez 4 donneurs différents. La composition individuelle des NETs (ADN, LF, H3, ELA) était stable dans les 3 préparations de chaque donneur, mais variait d'un donneur à l'autre. Cette variabilité interindividuelle est probablement en partie liée à la variation du taux de NETose, comme cela a été évoqué récemment par l'équipe de Zychlinsky.

Enfin, pour évaluer l'activité biologique des NETs purifiés, nous avons testé leur effet bactéricide vis à vis de plusieurs souches : *Shigella flexeneri* M90T, *Salmonella*

*enterica* serovar typhimurium SL1344, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* C1845. Les NETs isolés possèdent une activité microbicide d'environ 70% avec ces quatre souches bactériennes. Cette bactéricide est en partie inhibée par la DNase, ce qui suggère que la structure des NETs potentialise cet effet de façon importante.

Au total, nous avons mis au point un modèle de production, isolement, quantification et caractérisation de NETs à partir de PN humains frais. Ces NETs isolés conservent leur composition en ADN et protéines mais aussi leur activité fonctionnelle, microbicide et enzymatique. Ce modèle constitue un outil reproductible utilisable pour évaluer l'effet des NETs sur certains acteurs de la réponse immunitaire.



# An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps

Lorena Barrientos<sup>1,2†</sup>, Viviana Marin-Esteban<sup>1,2†</sup>, Luc de Chaisemartin<sup>1,2,3</sup>, Vanessa Lievin Le-Moal<sup>2,4</sup>, Catherine Sandré<sup>1,2</sup>, Elsa Bianchini<sup>2,5</sup>, Valerie Nicolas<sup>6</sup>, Marc Pallardy<sup>1,2</sup> and Sylvie Chollet-Martin<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM, UMR-S 996, "Cytokines, Chemokines and Immunopathology", UniverSud, Paris, France

<sup>2</sup> Faculté de Pharmacie, UniverSud, Paris, France

<sup>3</sup> AP-HP, Groupe Hospitalier Paris Nord Val de Seine, Hôpital Bichat, Unité d'Immunologie «Auto-immunité et Hypersensibilités», Paris, France

<sup>4</sup> CNRS, UMR 8076 (BioCIS), Equipe «chimiothérapie antiparasitaire», Faculté de Pharmacie, UniverSud, Paris, France

<sup>5</sup> Laboratoire d'hématologie, EA 4531, Faculté de Pharmacie, UniverSud, Paris, France

<sup>6</sup> IFR 141, IPSIT «Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique», Plateforme Imagerie Cellulaire, Faculté de Pharmacie, Paris, France

## Edited by:

Ulrich Blank, Université Paris-Diderot Paris 7, France

## Reviewed by:

Jan Peters, University of Tennessee Health Science Center, USA

Ulrich Blank, Université Paris-Diderot Paris 7, France

## \*Correspondence:

Sylvie Chollet-Martin, Faculté de Pharmacie, INSERM UMR-S 996, 5 rue J. B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry cedex, Paris, France  
e-mail: sylvie.chollet-martin@u-psud.fr

<sup>†</sup> Lorena Barrientos and Viviana Marin-Esteban have contributed equally to this work.

Netosis is a recently described neutrophil function that leads to the release of neutrophil extracellular traps (NETs) in response to various stimuli. NETs are filaments of decondensed chromatin associated with granular proteins. In addition to their role against microorganisms, NETs have been implicated in autoimmunity, thrombosis, and tissue injury. Access to a standardized source of isolated NETs is needed to better analyze the roles of NETs. The aim of this study was to develop a procedure yielding soluble, well-characterized NET preparations from fresh human neutrophils. The calcium ionophore A23187 was chosen to induce netosis, and the restriction enzyme *AluI* was used to prepare large NET fragments. DNA and proteins were detected by electrophoresis and specific labeling. Some NET proteins [histone 3, lactoferrin (LF)] were quantified by western blotting, and double-stranded DNA (dsDNA) was quantified by immunofluorescence. Co-existence of dsDNA and neutrophil proteins confirmed the quality of the NET preparations. Their biological activity was checked by measuring elastase (ELA) activity and bacterial killing against various strains. Interindividual differences in histone 3, LF, ELA, and dsDNA relative contents were observed in isolated NETs. However, the reproducibility of NET preparation and characterization was validated, suggesting that this interindividual variability was rather related to donor variation than to technical bias. This standardized protocol is suitable for producing, isolating, and quantifying functional NETs that could serve as a tool for studying NET effects on immune cells and tissues.

**Keywords:** neutrophil, netosis, neutrophil extracellular traps, isolation, quantification, characterization, microbicidal activity

## INTRODUCTION

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are the most abundant white blood cells in humans. In addition to their crucial role in protecting against infections, recent evidence suggests that PMN are also key components of the effector and regulatory mechanisms of both innate and adaptive immune responses (Mantovani et al., 2011; Phillipson and Kubes, 2011). PMN are the first cells to migrate to sites of infection and sterile inflammation, and exhibit a wide range of sophisticated functions. A new function, netosis, was described in Brinkmann et al. (2004).

During netosis, PMN release neutrophil extracellular traps (NETs) that can entangle pathogens but also contribute to various inflammatory diseases. PMN undergo specific morphological changes during netosis, but the molecular mechanisms of DNA release are not yet fully understood. First, chromatin decondensation leads to the loss of the lobulated nucleus. Then, disintegration of intracellular membranes allows chromatin and extranuclear proteins to mix. The final step is the release into the extracellular medium of chromatin filaments decorated with PMN proteins

derived from several cell compartments (Fuchs et al., 2007). Netosis is dependent on the oxidative burst, via NADPH-oxidase 2 (NOX-2) and rho small GTPase Rac2 activation (Bianchi et al., 2011; Lim et al., 2011), as well as on histone citrullination by peptidylarginine deiminase (PAD4) (Li et al., 2010; Neeli and Radic, 2012) and nuclear translocation of granular myeloperoxidase (MPO) and elastase (ELA) (Metzler et al., 2010; Papayannopoulos et al., 2010). Recently, dynamic observations *in vivo* showed that NET-bearing PMN are still able to crawl and to engage FcγRIIA to internalize immune complexes (Chen et al., 2012; Yipp et al., 2012). Eosinophils (Yousefi et al., 2012), basophils, mast cells (von Kockritz-Blickwede et al., 2008), and probably other cell types can also produce extracellular traps.

A proteomic study of NETs identified 24 different proteins. Histones accounted for more than 70% of total NET proteins, while ELA, calprotectin, and lactoferrin (LF) were the most abundant non-nuclear proteins, representing between 2 and 6% of total proteins (Urban et al., 2009). During the last 2 years, we and others have identified other proteins associated with NETs,

such as pentraxin 3,  $\beta 2$  integrin, HMGB1, and LL37 (Jaillon et al., 2007; Garcia-Romo et al., 2011; Marin-Esteban et al., 2012). Some reports suggest that NET protein diversity depends on the priming agent and/or the stimulus that triggers netosis (Garcia-Romo et al., 2011).

The main known function of NETs is to trap and kill microbes. Two recent reviews (Brinkmann and Zychlinsky, 2012; Kaplan and Radic, 2012) concluded that a broad variety of pathogens can induce and/or be killed by NETs, including bacteria, fungi, protozoan parasites, and even viruses (including HIV1). However, proteins contained in NETs can also have detrimental effects on the host. Indeed, we have previously reported that NETs can damage intestinal epithelial cells (Marin-Esteban et al., 2012), while histones are known to damage endothelial tissue, particularly during systemic lupus erythematosus (SLE) and sepsis (Xu et al., 2009; Villanueva et al., 2012). One of the most exposed organs might be the lung, as NET-induced damage has been reported *in vivo* during asthma, adult respiratory distress syndrome, transfusion-related acute lung injury, and cystic fibrosis (Dubois et al., 2012; Cheng and Palaniyar, 2013). Another adverse effect of NETs is their ability to hyperactivate the coagulation system, leading to atherosclerosis and thrombosis (Doring et al., 2012; Fuchs et al., 2012), and also to sepsis via tissue factor exposure (Kambas et al., 2012).

A role of NETs in tolerance-breaking and induction of autoimmunity is very probable, particularly in SLE (Bouts et al., 2012) and small-vessel vasculitis (Garcia-Romo et al., 2011; Cui et al., 2012; Sangaletti et al., 2012; Villanueva et al., 2012). Indeed, NET release exposes cytoplasmic, granular, and nuclear self antigens to the immune system. The antigenicity of these components may be modified by post-translational modifications such as oxidation and citrullination, or by intermolecular associations (Metzler et al., 2010; Papayannopoulos et al., 2010; Kambas et al., 2012; Liu et al., 2012; Neeli and Radic, 2012). For instance, LL37 renders NET-associated DNA immunogenic, making it able to activate plasmacytoid dendritic cells and to release type 1 interferons (Garcia-Romo et al., 2011).

This short summary of the literature evidences that several questions are still open. In particular, the effects of NET components on host cells and tissues are complex and difficult to assess. Interestingly, there is growing evidence that NETs might allow sustained cross-talk between PMN components and other immune cells such as dendritic cells and lymphocytes (Sangaletti et al., 2012; Tillack et al., 2012). Access to a standardized source of isolated NETs is needed to further analyze their role in both normal and abnormal immune responses. A few approaches to NET preparation have already been described. One consists of NET digestion by DNase I, followed by acetone protein precipitation (Urban et al., 2009). Another consists of physical NET dissociation by vigorous agitation, followed by MNase or DNase I digestion, yielding small NETs containing both DNA and proteins (Liu et al., 2012; Saffarzadeh et al., 2012). However, some authors have reported that the microbicidal effect of NETs is lost after DNase treatment [due to double-stranded DNA (dsDNA) damage], and that small mono- or oligonucleotide structures are created by MNase treatment (Fuchs et al., 2007; Urban et al., 2009; Saffarzadeh et al., 2012).

Here we describe an alternative standardized procedure to isolate large soluble NETs from human PMN. Calcium ionophore A23187 was used to induce netosis, and the restriction enzyme *AluI* was used to recover large heterogeneous NET fragments. Samples were standardized by quantifying four key NET components, namely dsDNA, histone H3 (H3), LF, and ELA. Isolated NETs exhibited biological activity, as shown in terms of ELA activity and bacterial killing.

## MATERIALS AND METHODS

### ISOLATION OF HUMAN BLOOD POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHILS

Polymorphonuclear neutrophils were isolated from fresh buffy coats prepared from blood of healthy donors, provided by Etablissement Français du Sang (Rungis, France). First, leukocytes were separated from erythrocytes by sedimentation on a separating medium containing 5% Dextran T500® (Pharmacia, Uppsala, Sweden) in 0.9% saline. PMN were separated from mononuclear cells by Ficoll centrifugation ( $d = 1.077$  g/L, Eurobio, Les Ulis, France). Contaminating erythrocytes were removed by hypotonic lysis, and PMN were resuspended in Hank's buffered salt solution (HBSS) (Gibco Life Technologies, Saint Aubin, France) supplemented with 0.05% fetal calf serum (FCS) (PAA, Les Mureaux, France) and 10 nM Heparin (Gibco).

### TIME COURSE OF NET RELEASE AFTER PMN STIMULATION WITH PMA OR A23187

Freshly isolated PMN were immediately seeded in 96-well black plates ( $2 \times 10^5$  cells/well) in the presence of 5  $\mu$ M Sytox Green (Invitrogen, Saint Aubin, France), a non-cell-permeant DNA binding dye. Cells were then stimulated with increasing concentrations (2–250 nM) of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma Aldrich, Lyon, France) or the calcium ionophore A23187 (0.2–25  $\mu$ M) (EMD chemicals, San Diego, CA, USA) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in the dark. DNA release was followed by measuring green fluorescence at 0, 60, 120, 180, and 240 min in a microplate fluorescence reader (Tristar™ LB941 BERTHOLD, Bad Wildbad, Germany) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 527 nm. All samples were tested in duplicate. These experiments allowed us to determine the optimal concentration of each stimulus, as well as the time of maximal NET release.

### IMMUNOFLUORESCENCE LABELING AND OBSERVATION OF NETs

Freshly isolated PMN were seeded on polylysine-coated glass coverslips ( $2 \times 10^5$  cells/well), allowed to settle, and then treated with 50 nM PMA or 5  $\mu$ M A23187 at 37°C, as previously described (Marin-Esteban et al., 2012). After 3 h of activation, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (Electron Microscopy Sciences, Hartfield, PA, USA) at room temperature. Samples were then washed with phosphate buffered saline (PBS, Gibco Life Technologies), blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) (PAA) and incubated with antibodies against ELA, LF (Sigma Aldrich), H3 (EMD chemicals), or citrullinated-histone H3 (cit-H3) (clone ab5103, Abcam, Cambridge, UK) for 30 min at room temperature, followed by Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG for 30 min (Molecular Probes, Karlsruhe, Germany). Isotype-matched antibodies were used as

controls. The coverslips were mounted in medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) to label DNA. Cells were examined with an inverted epifluorescence microscope (AxioObserver Z1\_Colibri, Zeiss, Germany) equipped with an MRm CCD camera. All images were acquired with a Plan-Apochromat 63X/1.4 NO oil immersion objective, using two light-emitting diodes (365 and 470 nm) for excitation and two bandpass filters (445/450 and 530/550 nm) to collect blue and green fluorescence, respectively.

### NET DIGESTION BY NUCLEASES

In a first set of experiments, 4  $\mu\text{g}$  of purified  $\lambda\text{DNA}$  (Invitrogen) was treated with 4 U/mL DNase I (Sigma Aldrich), 4 U/mL MNase (New England BioLabs, France), or 4 U/mL *AluI* (New England BioLabs) for 20 min at 37°C. The samples were then loaded on 0.8% agarose gels (w/v) prepared in Tris-acetate-EDTA buffer containing 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ethidium bromide (Invitrogen). Electrophoresis was run at 100V for 30 min and DNA was visualized with an ultraviolet transilluminator (MiniBIS-Pro, DNR Bio-imaging Systems).

In a second set of experiments, A23187-stimulated PMN seeded in 12-well culture plates were treated with or without various concentrations of *AluI*, DNaseI, or MNase (0.8, 4, and 20 U/mL) for 20 min at 37°C. The supernatant of each well was harvested and DNA was analyzed after electrophoresis, as described above.

### NET ISOLATION

Freshly isolated PMN were seeded in 12-well culture plates ( $1.5 \times 10^6$  cells/well) and stimulated with PMA (50 nM) or A23187 (5  $\mu\text{M}$ ). After 3 h at 37°C in the presence of 5%  $\text{CO}_2$ , each well was carefully washed twice with 1 mL PBS and then treated with 400  $\mu\text{l}$  of the restriction enzyme *AluI* at 4 U/mL for 20 min at 37°C. The supernatant of each well was collected and centrifuged for 5 min at  $300 \times g$  at 4°C in order to remove whole cells and debris. The NET-rich supernatants were then characterized for their DNA and protein contents, using several approaches.

### DNA OBSERVATION AND QUANTIFICATION

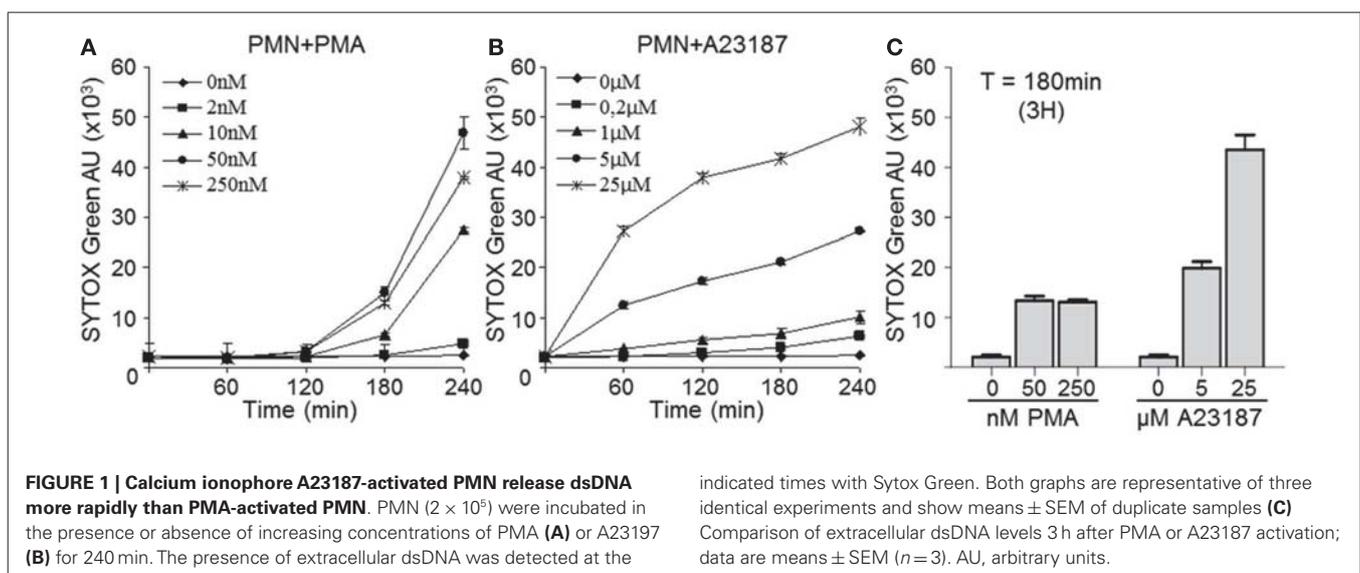
The size of the recovered DNA fragments was estimated after electrophoresis as described above. DNA was quantified in NET samples by using Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Molecular Probes), an ultrasensitive fluorescent nucleic acid stain designed to quantify dsDNA in solution. The manufacturer's instructions were followed, and calibration standards between 30 and 1000 ng/mL dsDNA were used. Fluorescence signals were measured in a microplate fluorescence reader (Tristar™ LB941).

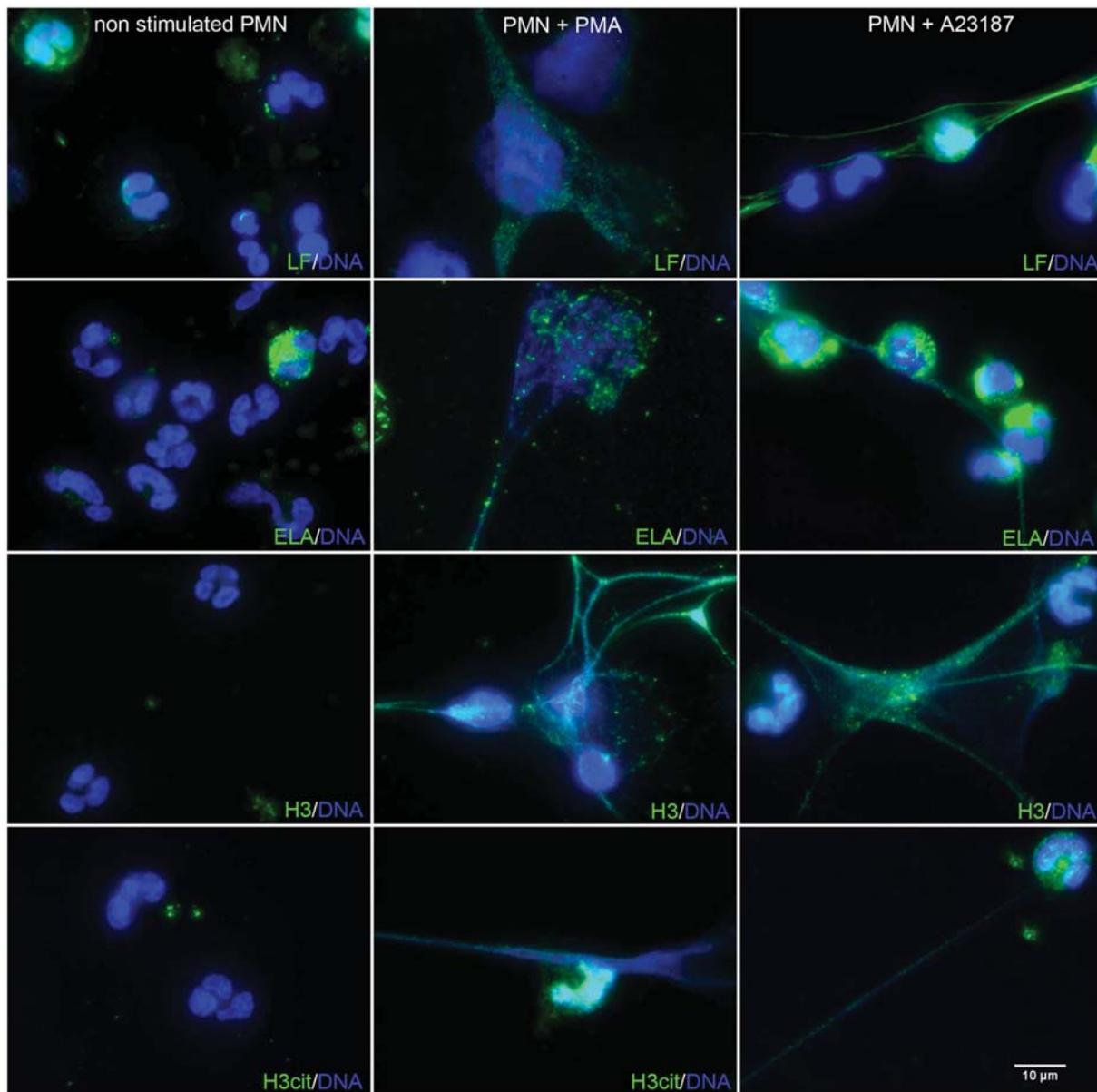
### QUANTIFICATION OF TOTAL PROTEIN, HISTONE 3, AND LACTOFERRIN

Total NET protein was quantified with a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Protein diversity was explored by SDS-PAGE. Proteins (30  $\mu\text{g}$  of total protein) were separated in denaturing and reducing conditions by electrophoretic migration in 15% acrylamide gel, and then revealed by silver staining. To quantify specific NET proteins, 30  $\mu\text{g}$  of total NET protein and various amounts of purified H3 (0.5–2 ng/ $\mu\text{L}$ ) or LF (0.5–2 ng/ $\mu\text{L}$ ) (Sigma Aldrich) were separated by electrophoresis in the same gel. Proteins were then transferred to Hybond membranes (Amersham Biosciences, Velizy-Villacoublay, France) overnight at 40 V and 4°C. After blocking with BSA, membranes were incubated with the antibodies against H3, cit-H3, and LF as described above. Primary antibody binding was detected with a goat anti-rabbit IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and visualized by EZ-ECL (Biological Industries, Israel). Yields were calculated and H3 and LF levels were expressed as  $\mu\text{g}$  per  $10^6$  PMN.

### QUANTIFICATION OF ELASTASE ACTIVITY

Elastase activity in NET samples was measured with an enzymatic kinetic method using the ELA substrate I (EMD chemicals) Boc-Ala-Ala-Pro-Ala-pNA (Boc = t-butoxycarbonyl; pNA = para-nitroanilide). NET solution and ELA substrate I at 222  $\mu\text{M}$  in kinetic buffer (20 mM phosphate buffer, 0.15 M NaCl, 0.1 mM EDTA, and 0.1% PEG-8000, pH 7.4) were mixed at a volume ratio of 1:10 and the initial velocity of pNA release was





**FIGURE 2 | A23187-stimulated PMN release NETs similar to those induced by PMA.** PMN were treated with PMA (50 nM) or A23187 (5  $\mu$ M) for 3 h. NETs were observed by immunofluorescence microscopy after DNA staining with DAPI (blue), and after

elastase, LF, H3, or cit-H3 staining with specific Abs followed by an Alexa Fluor 488-labeled secondary antibody (green). These experiments were repeated at least six times with PMN from different healthy controls.

recorded by measuring absorbance at 405 nm in a microplate reader. Various concentrations of purified ELA from human neutrophils (EMD chemicals) were used as standards. The reaction rate and corresponding ELA activity were determined using GraphPad® software. Yields were calculated and H3 and LF levels were expressed as  $\mu$ g per  $10^6$  PMN.

#### REPRODUCIBILITY TESTING

In order to validate our isolation technique, we assessed reproducibility testing. Fresh blood was obtained from four healthy

donors. Each sample was immediately divided into three equal parts before PMN isolation. The NET-production protocol described above was then applied in order to get three NET samples for each donor. All the NET-rich supernatants were then characterized by assaying dsDNA, H3, LF, and ELA in triplicate as described above.

#### BACTERIAL KILLING ASSAY

Exponentially growing wild-type Afa/Dr DAEC strain C1845, wild-type *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain

SL1344, wild-type *Shigella flexneri* strain M90T, and a clinical culture collection *Staphylococcus aureus* strains (Microbiology laboratory, Faculty of Pharmacy, Châtenay-Malabry, France) were subcultured in Luria–Bertani (LB) broth at 37°C for 18 h. Bacteria were washed, counted in a Salubini chamber, and adjusted to 10<sup>7</sup> colony forming units per mL (CFU/mL). Bacteria (100 µL) were incubated with isolated NETs at a final concentration of 50 ng/mL dsDNA for 45 min at 37°C. Samples were serially diluted, plated on LB agar, and incubated for 24 h at 37°C to determine the numbers of CFU/mL. Experiments were carried out in triplicate and repeated at least five times. Bacterial killing was determined as previously reported (Marin-Esteban et al., 2012).

### STATISTICAL ANALYSIS

The data were analyzed with GraphPad Prism 5.01. The non-parametric Mann–Whitney test was used for comparisons. Differences with *p* values below 0.05 were considered significant. All data are expressed as mean ± SEM.

## RESULTS

### CALCIUM IONOPHORE A23187 INDUCES NETOSIS

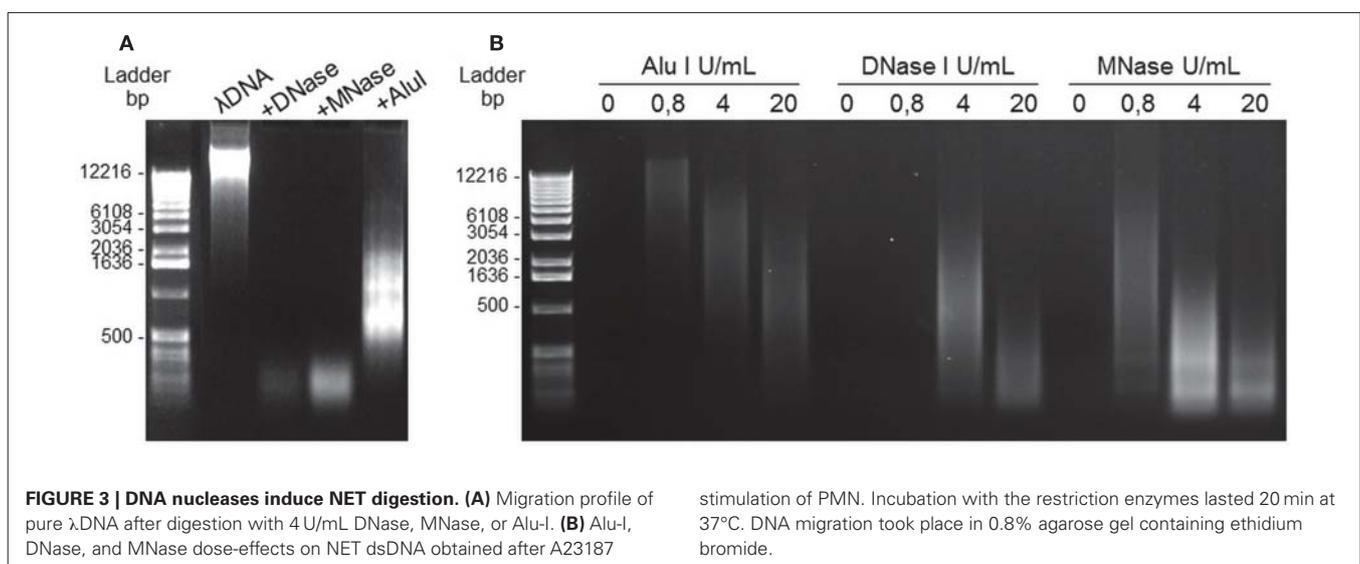
Netosis can be induced by various stimuli. PMA is generally used in the literature and was used here as a reference stimulus. In addition, we used calcium ionophore A23187, which is reported to be efficiently removed by washing steps (Betz and Henson, 1980). We compared the capacities of A23187 and PMA to induce human PMN netosis. NET release was monitored for 240 min by staining extracellular dsDNA with Sytox Green, a dye that is not incorporated by living cells. The green signal was weak and stable in resting PMN, while both PMA and A23187-induced dsDNA release in a time- and concentration-dependent manner, although with different kinetics (Figures 1A,B). With PMA concentrations of 10–250 nM, dsDNA release was detected after 120 min of incubation; at 250 nM PMA rather induced apoptosis as suggested by lower dsDNA levels and fragmented nuclei (not shown). With A23187 at 5 or 25 µM, extracellular dsDNA was detected after as little as 60 min. We therefore

chose 3 h as the optimal time of stimulation. Moreover, after comparing the two stimuli at this time point (Figure 1C), we chose 5 µM A23187 and 50 nM PMA as the optimal concentrations for inducing comparable netosis. In these conditions we found a large amount of extracellular dsDNA and only a small number of apoptotic or necrotic nuclei (DAPI staining, data not shown).

To confirm that the isolated extracellular DNA corresponded to NET structures, we used immunolabeling of proteins known to be associated with NETs, as previously described (Marin-Esteban et al., 2012). Figure 2 shows resting PMN, A23187-activated PMN, and PMA-activated PMN. In the absence of stimuli, PMN did not expose any intracellular protein and exhibited an intact polylobulated nucleus, suggesting nuclear, and plasma membrane integrity. As expected, DAPI-stained extracellular DNA structures were observed in response to PMA or A23187. These cable- or web-like structures corresponded to cell chromatin as they carried histones, as shown by the presence of H3. Cit-H3 was also present, confirming its formation through netosis. Colocalization of extracellular DNA structures with LF and ELA, two granule-associated proteins, confirmed that these structures were NETs. Together, these results show for the first time that, in these conditions, A23187 activates netosis in human PMN as efficiently as PMA, leading to NET release.

### A23187-INDUCED NETs CAN BE DIGESTED BY THE RESTRICTION ENZYME ALU-I

The next step was to separate NETs from the cell body while maintaining their structure. In order to define the optimal conditions, the effects of several restriction enzymes on purified DNA (λDNA) were first compared. As shown in Figure 3A, *AluI* yielded large heterogeneous DNA fragments, while *DNaseI* and *MNase* yielded smaller fragments. We then studied the concentration-response effect of these three enzymes on supernatants of A23187-stimulated PMN and confirmed that *AluI* was optimal to get large heterogeneous fragments (>0.5 kbp), as compared with *DNaseI* and *MNase* (Figure 3B).



NET-rich supernatants were then further analyzed. In supernatants from control resting PMN, *AluI* treatment yielded no dsDNA, indicating that *AluI* treatment itself induced no cell toxicity (Figure 4A). In contrast, in response to both stimuli, the samples contained a heterogeneous population of dsDNA fragments that migrated with a smearing pattern distributed from 0.5 kbp to more than 15 kbp. In these conditions the strongest signal corresponding to dsDNA fragments was comprised between 5 and 12 kbp (Figure 4A).

The protein composition of NETs was then evaluated by SDS-PAGE followed by silver staining (Figure 4B). Samples from resting PMN contained low concentrations of various proteins. In contrast, samples recovered after *AluI* treatment of PMA- or A23187-stimulated PMN yielded stronger signals. The presence of LF, reported to be the second most abundant granule-derived protein on NETs (Urban et al., 2009), was confirmed by western blot (Figure 4C). The low level of LF in unstimulated PMN samples was probably due to basal cell degranulation. We also confirmed the presence of histone H3, a chromatin-associated protein, in A23187- or PMA-treated PMN but not in samples from resting PMN. Interestingly, citrullinated H3 was also present in NET samples, providing the signature of netosis.

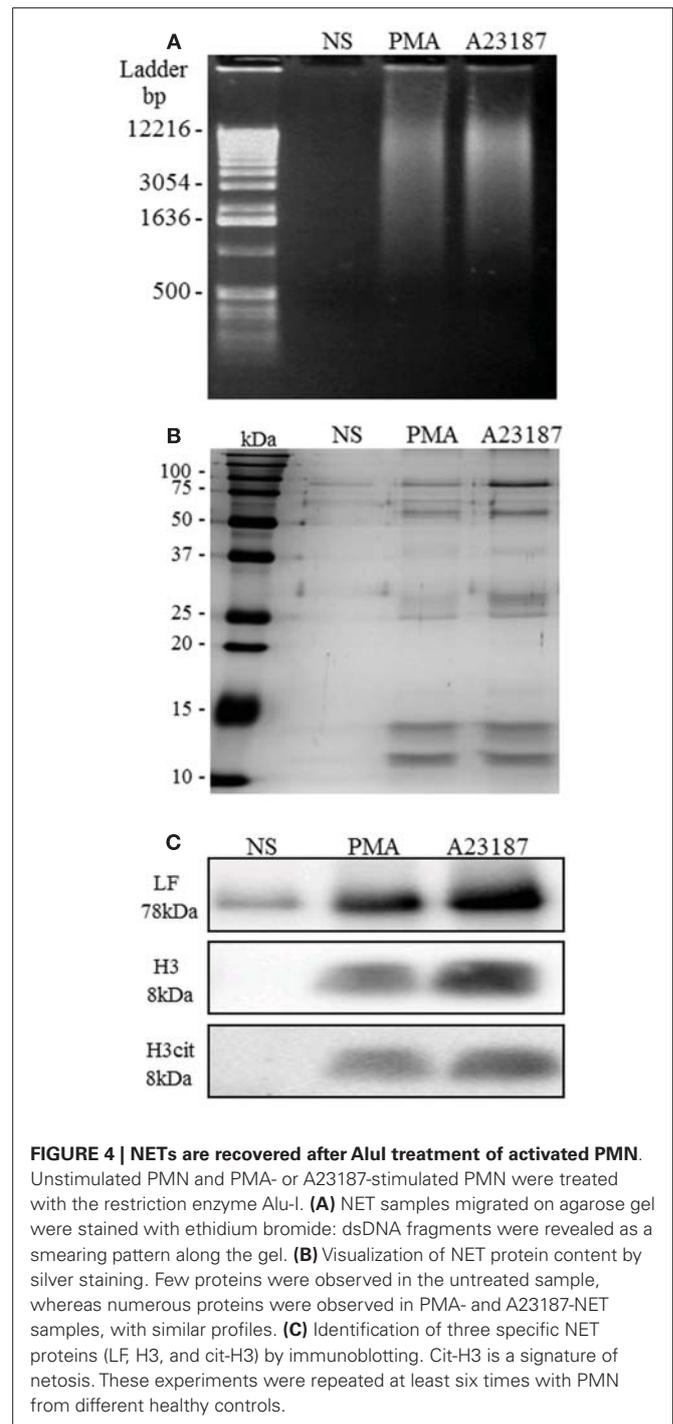
Taken together, these results showed that this *AluI*-based approach yielded large soluble NET fragments composed of DNA and numerous neutrophil proteins.

#### INTERINDIVIDUAL DIFFERENCES IN HISTONE 3, LF, ELA, AND dsDNA RELATIVE CONTENTS IN ISOLATED NETs

In order to better characterize NET composition and to standardize our protocol, we quantified four major constituents (LF, H3, dsDNA, and ELA) in NET samples obtained from 10 different healthy donors.

We first assessed LF and H3 concentrations by quantitative immunoblot analysis. Figure 5A illustrates the results of a typical experiment with both standards and a NET sample from one donor. The apparent molecular weight of NET-associated LF and of purified LF were similar, whatever the netosis trigger. In contrast, NET-associated H3 displayed more rapid electrophoretic migration than purified H3, with an apparent loss of 7 kDa, suggesting partial H3 degradation. We also quantified dsDNA, widely used in the literature as a reliable marker of netosis (Urban et al., 2009). Finally, we showed the biological activity of these NETs by quantifying NET-associated ELA activity in an enzymatic test (Metzler et al., 2010; Papayannopoulos et al., 2010).

Despite the use of standardized protocols, the concentrations of these four components (expressed in  $\mu\text{g}$  per  $10^6$  PMN, as described in Materials and Methods) differed across NETs from the 10 healthy controls (Figure 5B). The dsDNA content was the least variable parameter. Interestingly, the H3 content did not correlate with the dsDNA content, suggesting different degrees of chromatin decondensation or histone degradation in NETs from the different donors. LF and ELA levels did not correlate with dsDNA levels either. Importantly, 7 of the 10 NET preparations exhibited little ELA activity, whereas the 3 remaining samples showed high ELA activity. No statistically significant relationship was found between individual values of the four parameters in a given donor. This heterogeneity of NET composition might be



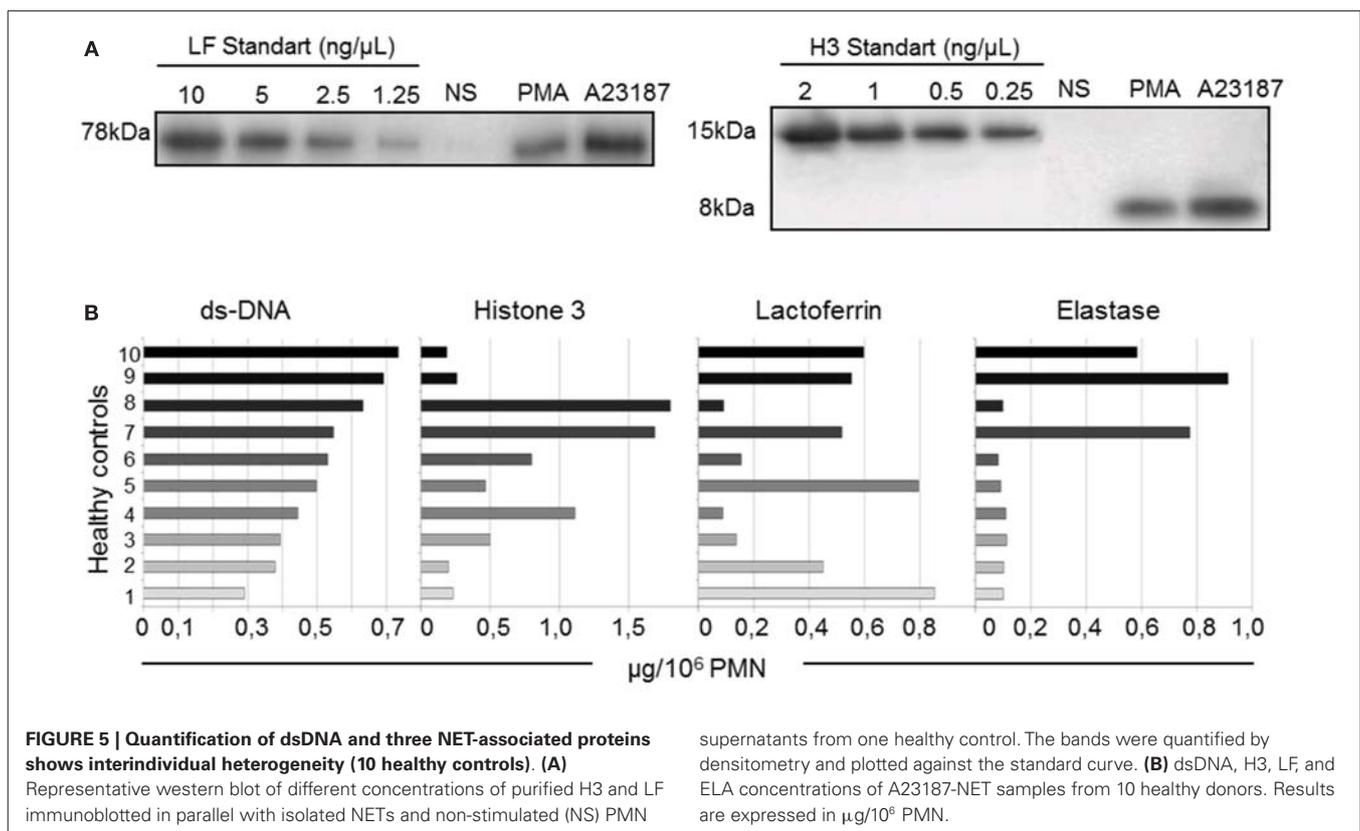
**FIGURE 4 | NETs are recovered after *AluI* treatment of activated PMN.**

Unstimulated PMN and PMA- or A23187-stimulated PMN were treated with the restriction enzyme *AluI*. (A) NET samples migrated on an agarose gel were stained with ethidium bromide: dsDNA fragments were revealed as a smearing pattern along the gel. (B) Visualization of NET protein content by silver staining. Few proteins were observed in the untreated sample, whereas numerous proteins were observed in PMA- and A23187-NET samples, with similar profiles. (C) Identification of three specific NET proteins (LF, H3, and cit-H3) by immunoblotting. Cit-H3 is a signature of netosis. These experiments were repeated at least six times with PMN from different healthy controls.

related to interindividual differences in the netosis response to a given stimulus.

#### THE ISOLATION NET TECHNIQUE IS REPRODUCIBLE

As interindividual variations were observed, we assessed reproducibility testing in additional four different healthy donors. We confirmed that the NET composition of the four donors was quite different in terms of dsDNA, H3, LF, and ELA levels. Interestingly, three independent NET samples were prepared for each donor that



gave similar results as evidenced in **Figure 6** (dsDNA, H3, LF, and ELA levels).

#### ISOLATED NETs RETAIN THEIR MICROBICIDAL ACTIVITY

Finally, we examined whether isolated NETs (obtained after PMA or A23187 stimulation) retained their bactericidal activity. We used four bacterial species previously shown by us and others to be killed by NETs (Brinkmann et al., 2004; Li et al., 2010; Marin-Esteban et al., 2012). *S. flexneri* strain M90T, *S. enterica* serovar typhimurium strain SL1344, *S. aureus*, and the wild-type *E. coli* strain C1845 were exposed to isolated NETs for 45 min. As shown in **Figure 7**, more than 90 and 70% of the bacteria, respectively, were killed by PMA-derived and A23187-derived NETs. In both cases this effect was partially dependent on DNA integrity, as DNase pretreatment of NETs increased bacterial viability; however, this effect of DNase was always significant for PMA-derived NETs but only against *S. aureus* and *S. enterica* SL1344 for A23187-derived NETs ( $p < 0.05$ ).

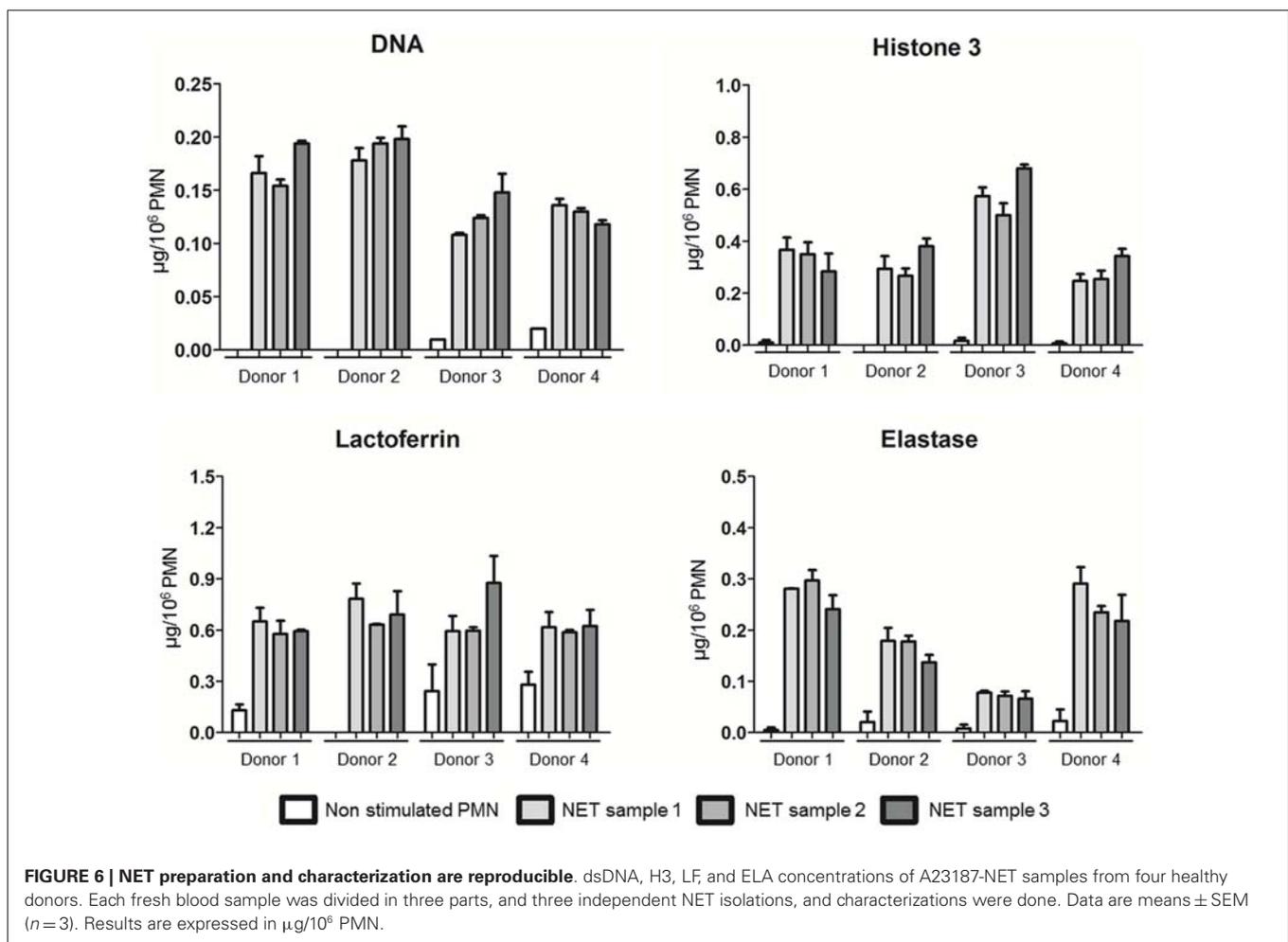
#### DISCUSSION

Neutrophil extracellular traps have been extensively studied since their discovery in 2004, but many aspects of their composition, roles, regulation, and involvement in disease states remain unclear and even controversial. In particular, the beneficial or detrimental effect of NETs might be determined by the intensity of the netosis response, and better knowledge of netosis could thus help to design NET-targeting therapies (Brinkmann and Zychlinsky, 2012; Cheng and Palaniyar, 2013; Simon et al., 2013). However, standardized

procedures are needed to isolate NETs suitable for such studies. Brinkmann et al. (2012) recently described a simple automated method of NET quantification. Here, we describe a novel approach to recover, characterize and quantify large functional NETs produced by human neutrophils.

The first step was to identify an appropriate NET inducer. Calcium ionophore A23187 was chosen because it was as potent as PMA, did not induce cell death and can be efficiently removed by washing. Moreover, A23187 has been shown to trigger netosis of neutrophils from zebrafish (Palic et al., 2007) and of the myeloid leukemia cell line HL-60 (Wang et al., 2009). The second step was to determine the most appropriate nuclease for NET digestion. As DNase might inhibit the microbicidal effect of NETs (Urban et al., 2009) and as MNase is known to generate only small NET structures (Liu et al., 2012; Saffarzadeh et al., 2012), we chose Alu-I, which yielded heterogeneous populations of dsDNA fragments ranging from 0.5 kbp to more than 15 kbp. NETs of various sizes, including large fragments, are likely to be more physiologically relevant than small NETs obtained with DNase or MNase.

In addition to DNA, we quantified the proteins LF, ELA, and H3 in isolated NETs. LF and ELA are important mediators of netosis, as they are involved in pathogen destruction and cell activation or toxicity. Our NET samples also contained citrullinated H3 (H3cit), one the main signatures of netosis (Li et al., 2010; Neeli and Radic, 2012). During netosis, histones are degraded by ELA and undergo citrullination of lysine residues by the enzyme PAD4 (Urban et al., 2009; Papayannopoulos et al., 2010; Neeli and Radic, 2012), both processes contributing to the lower molecular weight

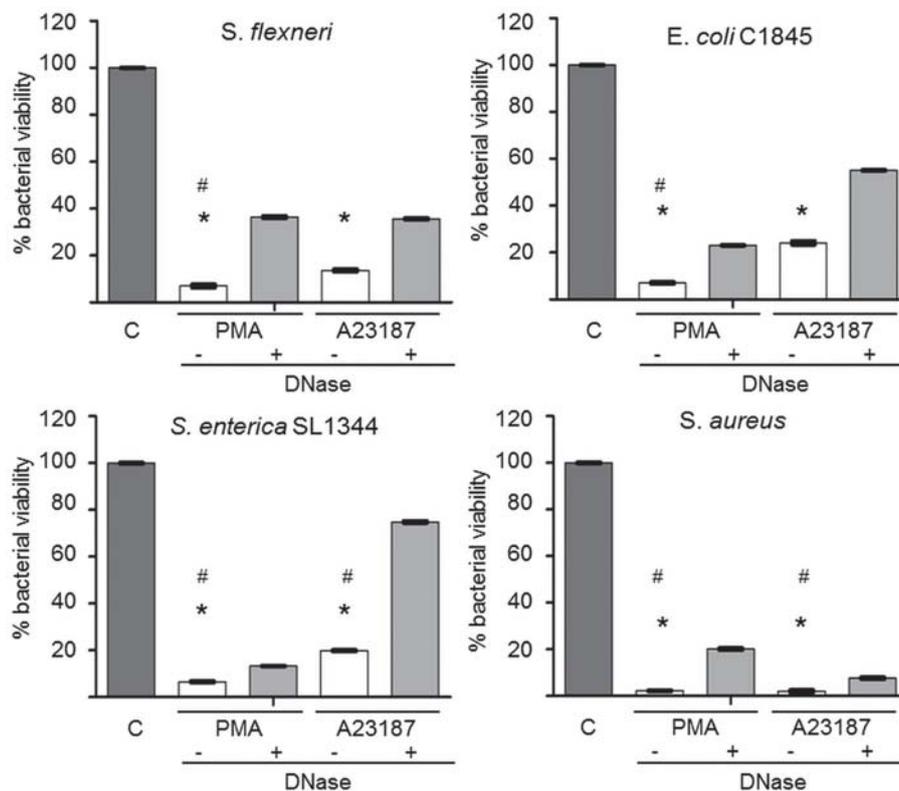


of H3 that we observed on NET immunoblots. As our aim was to develop a standardized procedure for isolating human NETs, we compared the composition of NETs obtained with neutrophils from 10 healthy volunteers. Interestingly, NETs from the different donors contained differing amounts of LF, ELA, H3, H3cit, and DNA. This interindividual variability may be related to variations in the rate of netosis, as reported by Urban et al. (2009) and more recently confirmed by Brinkmann et al. (2012). Interindividual variations in both the netosis rate and NET composition should therefore be taken into account when assessing netosis in clinical situations. Reproducibility of NET preparation and characterization was validated, suggesting that the interindividual variability in NET composition was related to donor variation, and not to technical bias.

We found that our isolated NETs retained their microbicidal activity, which reached about 70% with four different bacterial strains. This bactericidal effect was only partially reversed by DNase, suggesting that NET structure is important but that soluble microbicidal mediators are also involved. NET-mediated killing appears to be related to electrostatic interactions, histones, and high local concentrations of antimicrobial peptides such as proteases, defensins, and cathelicidin (Brinkmann and Zychlinsky,

2012; Simon et al., 2013). In our model, these peptides appeared to retain their antimicrobial capacity. However, NET-mediated antimicrobial activity is controversial (Nauseef, 2012; Simon et al., 2013). Indeed, recent studies suggest that NETs might simply have a bacteriostatic effect, through physical containment (Menegazzi et al., 2012). However, the bacterial killing observed with our NET preparations, which are smaller than PMN-associated non-digested NETs *in vivo*, suggests that physical containment might not be essential for NET antibacterial activity. This question could be addressed using our NET model.

Neutrophil extracellular traps can also damage host tissues by releasing proteases such as ELA (Marin-Esteban et al., 2012; Saffarzadeh et al., 2012; Villanueva et al., 2012). As our NET preparations exhibited ELA activity, our model would be suitable for studying NET-induced host cell cytotoxicity (Metzler et al., 2010; Papayannopoulos et al., 2010). Saffarzadeh et al. (2012) recently showed that MNase-derived isolated NETs were cytotoxic for endothelial cells via histone- and MPO-dependent mechanisms. Conversely, the cytotoxic activity of non-isolated NETs cocultured with endothelial cells can be partially down regulated by MNase treatment (Villanueva et al., 2012). These results illustrate the potential interference arising from PMN-derived elements



**FIGURE 7 | Alu-I-derived NETs retain microbicidal activity partially dependent on DNA integrity.** *S. aureus*, *E. coli* C1845, *S. flexneri*, and *S. enterica* serovar Typhimurium SL1344 were incubated for 45 min in the presence of isolated NETs obtained after *AluI* treatment of A23187- or PMA-activated PMN. In some experiments, NET samples were pretreated

with DNase to dismantle NETs. Bacterial viability was measured by a colony count assay (CFU/mL). Results are expressed as percentage bacterial viability, calculated from CFU/mL values of bacteria exposed to NETs relative to bacteria not exposed to NETs (control tube = C). \* $p < 0.05$  versus bacterial viability in the absence of NETs. # $p < 0.05$  versus DNase-treated NETs.

when NETs are not isolated, and underline the importance of standardizing NET isolation.

Neutrophil extracellular traps have recently been shown to modulate various immune cell functions, activating plasmacytoid dendritic cells (Villanueva et al., 2012) and myeloid dendritic cells (Sangaletti et al., 2012), inducing autoimmune responses (Sangaletti et al., 2012; Simon et al., 2013), and priming T lymphocytes by lowering the TCR activation threshold (Tillack et al., 2012). These findings were made using small MNase-digested NETs. The importance of the integrity of larger NET structures in other NET effects on adaptive immune responses could be examined using our standardized model.

## REFERENCES

- Betz, S. J., and Henson, P. M. (1980). Production and release of platelet-activating factor (PAF); dissociation from degranulation and superoxide production in the human neutrophil. *J. Immunol.* 125, 2756–2763.
- Bianchi, M., Niemiec, M. J., Siler, U., Urban, C. F., and Reichenbach, J. (2011). Restoration of anti-*Aspergillus* defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, e1247. doi:10.1016/j.jaci.2011.01.021
- Bouts, Y. M., Wolthuis, D. F., Dirks, M. F., Pieterse, E., Simons, E. M., Van Boekel, A. M., et al. (2012). Apoptosis and NET formation in the pathogenesis of SLE. *Autoimmunity* 45, 597–601. doi:10.3109/08916934.2012.719953
- Brinkmann, V., Goosmann, C., Kuhn, L. I., and Zychlinsky, A. (2012). Automatic quantification of in vitro NET formation. *Front. Immunol.* 3:413. doi:10.3389/fimmu.2012.00413
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., et al. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535. doi:10.1126/science.1092385
- Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* 198, 773–783. doi:10.1083/jcb.201203170
- Chen, K., Nishi, H., Travers, R., Tsuboi, N., Martinod, K., Wagner, D. D., et al. (2012). Endocytosis of soluble

- immune complexes leads to their clearance by FcγRIIb but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIa in vivo. *Blood* 120, 4421–4431. doi:10.1182/blood-2011-12-401133
- Cheng, O. Z., and Palaniyar, N. (2013). NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Front. Immunol.* 4:1. doi:10.3389/fimmu.2013.00001
- Cui, B. B., Tan, C. Y., Schorn, C., Tang, H. H., Liu, Y., and Zhao, Y. (2012). Neutrophil extracellular traps in sterile inflammation: the story after dying? *Autoimmunity* 45, 593–596. doi:10.3109/08916934.2012.719952
- Doring, Y., Manthey, H. D., Drechsler, M., Lievens, D., Megens, R. T., Soehnlein, O., et al. (2012). Autoantigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis. *Circulation* 125, 1673–1683. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.046755
- Dubois, A. V., Gauthier, A., Brea, D., Varaigne, F., Diot, P., Gauthier, F., et al. (2012). Influence of DNA on the activities and inhibition of neutrophil serine proteases in cystic fibrosis sputum. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 47, 80–86. doi:10.1165/rcmb.2011-0380OC
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., et al. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176, 231–241. doi:10.1083/jcb.200606027
- Fuchs, T. A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D. D. Jr., et al. (2012). Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 15880–15885. doi:10.1073/pnas.1005743107
- García-Romo, G. S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., et al. (2011). Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 3, 73ra20. doi:10.1126/scitranslmed.3001201
- Jaillon, S., Peri, G., Delneste, Y., Fremaux, I., Doni, A., Moalli, F., et al. (2007). The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J. Exp. Med.* 204, 793–804. doi:10.1084/jem.20061301
- Kambas, K., Mitroulis, I., Apostolidou, E., Girod, A., Chrysanthopoulou, A., Pneumatikos, I., et al. (2012). Autophagy mediates the delivery of thrombogenic tissue factor to neutrophil extracellular traps in human sepsis. *PLoS ONE* 7:e45427. doi:10.1371/journal.pone.0045427
- Kaplan, M. J., and Radic, M. (2012). Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J. Immunol.* 189, 2689–2695. doi:10.4049/jimmunol.1201719
- Li, P., Li, M., Lindberg, M. R., Kennett, M. J., Xiong, N., and Wang, Y. (2010). PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* 207, 1853–1862. doi:10.1084/jem.20100239
- Lim, M. B., Kuiper, J. W., Katchky, A., Goldberg, H., and Glogauer, M. (2011). Rac2 is required for the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Leukoc. Biol.* 90, 771–776. doi:10.1189/jlb.1010549
- Liu, C. L., Tangsombatvisit, S., Rosenberg, J. M., Mandelbaum, G., Gillespie, E. C., Gozani, O. P., et al. (2012). Specific post-translational histone modifications of neutrophil extracellular traps as immunogens and potential targets of lupus autoantibodies. *Arthritis Res. Ther.* 14, R25. doi:10.1186/ar3933
- Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., and Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 519–531. doi:10.1038/nri3024
- Marin-Esteban, V., Turbica, I., Dufour, G., Semiramoth, N., Gleizes, A., Gorges, R., et al. (2012). Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain C1845 induces neutrophil extracellular traps that kill bacteria and damage human enterocyte-like cells. *Infect. Immun.* 80, 1891–1899. doi:10.1128/IAI.00050-12
- Menegazzi, R., Declava, E., and Dri, P. (2012). Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood* 119, 1214–1216. doi:10.1182/blood-2011-07-364604
- Metzler, K. D., Fuchs, T. A., Nauseef, W. M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., et al. (2010). Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 117, 953–959. doi:10.1182/blood-2010-06-290171
- Nauseef, W. M. (2012). Editorial: Nyet to NETs? A pause for healthy skepticism. *J. Leukoc. Biol.* 91, 353–355. doi:10.1189/jlb.1011495
- Neeli, I., and Radic, M. (2012). Knotting the NETs: analyzing histone modifications in neutrophil extracellular traps. *Arthritis Res. Ther.* 14, 115. doi:10.1186/ar3773
- Palic, D., Andreassen, C. B., Ostojic, J., Tell, R. M., and Roth, J. A. (2007). Zebrafish (*Danio rerio*) whole kidney assays to measure neutrophil extracellular trap release and degranulation of primary granules. *J. Immunol. Methods* 319, 87–97. doi:10.1016/j.jim.2006.11.003
- Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., and Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 191, 677–691. doi:10.1083/jcb.201006052
- Phillipson, M., and Kubes, P. (2011). The neutrophil in vascular inflammation. *Nat. Med.* 17, 1381–1390. doi:10.1038/nm.2514
- Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M. A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S. P., et al. (2012). Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS ONE* 7:e32366. doi:10.1371/journal.pone.0032366
- Sangaletti, S., Tripodo, C., Chiodoni, C., Guarotta, C., Cappetti, B., Casalini, P., et al. (2012). Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells towards ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* 120, 3007–3018. doi:10.1182/blood-2012-03-416156
- Simon, D., Simon, H. U., and Yousefi, S. (2013). Extracellular DNA traps in allergic, infectious, and autoimmune diseases. *Allergy* 68, 409–416. doi:10.1111/all.12111
- Tillack, K., Breiden, P., Martin, R., and Sospedra, M. (2012). T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.* 188, 3150–3159. doi:10.4049/jimmunol.1103414
- Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., et al. (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 5:e1000639. doi:10.1371/journal.ppat.1000639
- Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C. C., Hodgin, J. B., Khandpur, R., Lin, A. M., et al. (2012). Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 187, 538–552. doi:10.4049/jimmunol.1100450
- von Kockritz-Blickwede, M., Goldmann, O., Thulin, P., Heinemann, K., Norrby-Teglund, A., Rohde, M., et al. (2008). Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood* 111, 3070–3080. doi:10.1182/blood-2007-07-104018
- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., et al. (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* 184, 205–213. doi:10.1083/jcb.200806072
- Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C. T., Semeraro, F., et al. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.* 15, 1318–1321. doi:10.1038/nm.2053
- Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N., Zbytniuk, L. D., et al. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* 18, 1386–1393. doi:10.1038/nm.2847
- Yousefi, S., Simon, D., and Simon, H. U. (2012). Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 736–739. doi:10.1016/j.coi.2012.08.010

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 10 April 2013; accepted: 11 June 2013; published online: 24 June 2013.  
 Citation: Barrientos L, Marin-Esteban V, de Chaisemartin L, Le-Moal VL, Sandré C, Bianchini E, Nicolas V, Pallardy M and Chollet-Martin S (2013) An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.* 4:166. doi: 10.3389/fimmu.2013.00166  
 This article was submitted to *Frontiers in Molecular Innate Immunity*, a specialty of *Frontiers in Immunology*.  
 Copyright © 2013 Barrientos, Marin-Esteban, de Chaisemartin, Le-Moal, Sandré, Bianchini, Nicolas, Pallardy and Chollet-Martin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

*Article 2*



---

Ce travail sera soumis prochainement pour publication.

Dans le but de mieux comprendre comment les PN peuvent participer à la régulation de la réponse adaptative, l'objectif de ce travail a été d'identifier les effets des NETs sur la maturation et sur certaines fonctions des DC.

Nous avons utilisé les préparations de NETs calibrées, décrites dans le travail précédent, ainsi que des DC humaines obtenues par différenciation *in vitro* de monocytes sanguins de donneurs sains obtenus auprès de l'établissement français du sang. Ces monocytes ont été purifiés par tri magnétique puis différenciés en DC immatures, en présence de GM-CSF et d'IL-4 pendant 5 jours.

Au cours de la première étape de ce travail nous avons suivi l'effet des NETs sur l'expression de différents marqueurs de la maturation des DC - HLA-DR, CD40, CD86, et CD80 - et sur la production de cytokines, analysées par cytométrie en flux et par ELISA ou par CBA, respectivement. Nos résultats montrent que les NETs seuls ne modifient pas l'état d'activation des DC après 24h de culture (phénotype et production de cytokines); en revanche, les NETs sont capables de moduler la maturation des DC activées par LPS. En effet, l'augmentation d'expression des marqueurs de maturation induite par le LPS est significativement diminuée en présence de NETs, entre 20 et 30% selon le marqueur. De même, la production des cytokines pro-inflammatoires et d'IL-10 induite par le LPS est significativement diminuée en présence de NETs, atteignant 50 à 60 % pour l'IL-6, l'IL-10, l'IL-23 et le TNF $\alpha$  et 80% pour l'IL-12. Nous avons vérifié que cet effet n'était pas lié à la présence de l'enzyme de restriction Alu I utilisée pour la préparation des NETs. De plus, cet effet n'est pas limité au LPS. En effet, d'autres *stimuli* des DC comme un agoniste de TLR-7/8, l'imidazoquinoline (R848) ou un activateur de la PKC, le Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), ont également un effet activateur diminué en présence de NETs.

Afin d'explorer les mécanismes impliqués, nous avons quantifié dans les DC l'expression transcriptionnelle de cytokines et de marqueurs de phénotype régulateur. Nous avons ainsi observé que la présence de NETs ne modifiait pas la cinétique de transcription des cytokines citées ci-dessus en réponse au LPS, mais que la quantité relative d'ARNm était toujours diminuée en présence de NETs. De plus, l'expression de gènes marqueurs de DC tolérogènes comme *GILZ*, *STAB1*, *C1qA*, *CATC* et *RALDH1*

n'est pas induite par les NETs seuls et n'est pas non plus modifiée par les NETs au cours de la stimulation des DC par le LPS. Les NETs ne semblent donc pas induire de phénotype régulateur et maintiennent des DC effectrices en réponse au LPS. Ces résultats orientent vers un effet plutôt anti-inflammatoire des NETs sur les DC/LPS.

L'étape suivante du travail a consisté à analyser les mécanismes d'interaction des NETs avec les DC en utilisant la quantification de la production de  $TNF\alpha$  comme marqueur d'activation. Nous avons d'abord exclu l'hypothèse que la régulation négative des NETs sur la maturation des DC pourrait être liée à une gêne à l'interaction LPS/TLR4. En effet, l'effet inhibiteur des NETs est observé même sur des DC qui ont été préalablement stimulées avec du LPS pendant quelques minutes puis lavées. De plus, nous avons vérifié que la diminution de la concentration du  $TNF\alpha$  dans les surnageants de DC activées n'était due ni à sa séquestration intra-cellulaire, ni à sa dégradation par les protéases des NETs une fois celui-ci libéré. Au total, les NETs auraient un effet direct sur les mécanismes d'activation des DC par le LPS.

La présence des NETs au cours de la maturation de DC ne semble pas diminuer la capacité de ces cellules à migrer. En particulier, leur migration vers les organes lymphoïdes pour rencontrer les LyT  $CD4^+$  serait maintenue. En effet, *in vitro*, la présence de NETs ne modifie pas, d'une part l'expression des récepteurs de chimiokines CCR7 et CXCR4 à la surface des DC, et, d'autre part, leur capacité de migration en réponse aux chimiokines, CCL19 et CXCL12, respectivement.

Les conséquences fonctionnelles inhibitrices des NETs sur les DC ont été ensuite analysées en étudiant leur impact sur l'activation des LyT  $CD4^+$ . Nous avons utilisé deux modèles de prolifération T *in vitro*, la réponse proliférative T allogénique et la réponse proliférative T spécifique d'un Ag (la toxine tétanique). Dans les deux cas, les DC activées par le LPS ayant été en contact avec des NETs, avaient une capacité réduite à activer la prolifération T. Enfin, nous avons étudié la capacité des DC à polariser les LyT  $CD4^+$  naïfs et avons démontré que les NETs modifiaient la capacité des DC matures à polariser la réponse lymphocytaire T. En effet, ces LyT produisent plus d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 et moins d'IFN $\gamma$  et d'IL-17A. Ainsi, les DC activées en présence des NETs favoriseraient la polarisation Th2 tout en réduisant la polarisation Th1 et Th17.

En résumé, ces résultats suggèrent que les NETs isolés régulent négativement la maturation des DC activées par des *stimuli* pro-inflammatoires comme le LPS, ce qui est confirmé par des modifications phénotypiques de marqueurs de membrane et de production de cytokines. Cet effet inhibiteur a des répercussions fonctionnelles sur les LyT dont la prolifération est réduite et dont le phénotype Th2 est favorisé. En revanche, les capacités migratoires de ces DC ne sont pas modifiées.

Nous proposons donc que la formation de NETs par les PN activés au cours de la réponse inflammatoire représente aussi un mécanisme de régulation de la réponse immunitaire adaptative en régulant la maturation des DC et certains de leur fonctions.



Neutrophil Extracellular Traps downregulate LPS-induced activation of  
monocyte-derived dendritic cells

Lorena Barrientos\*†, Alexandre Bignon\*¶, Claire Gueguen‡, Luc de Chaisemartin\*†§, Roseline Gorges\*†, Catherine Sandré\*†, Laurent Mascarell‡, Karl Balabanian\*¶, Saadia Kerdine-Römer\*†, Marc Pallardy\*†, Viviana Marin-Esteban\*||, Sylvie Chollet-Martin\*†§||

\* INSERM, UMR-S 996 “Cytokines, chemokines and immunopathology”, UniverSud, Châtenay-Malabry, France.

† UniverSud, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

‡ Stallergènes, Antony Cedex 92183, France;

§AP-HP, Groupe Hospitalier Paris Nord Val de Seine, Hôpital Bichat, Unité d’Immunologie « Auto-immunité et Hypersensibilités », 75018, Paris, France

¶ Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (LERMIT), Clamart, France

|| These two authors equally contributed to this work

**Corresponding author:** Sylvie Chollet-Martin, UMR-S 996, Faculté de Pharmacie, 5 rue J. B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry cedex, France. Phone: 33-1 46 83 55 27. Fax: 33-1 46 83 58 44. E-mail: [sylvie.chollet-martin@u-psud.fr](mailto:sylvie.chollet-martin@u-psud.fr)

**Short running title:** Anti-inflammatory effect of NETs



## Introduction

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are the first line of antimicrobial defence, rapidly recruited at the onset of inflammation. They are able to kill pathogens through numerous strategies such as phagocytosis, degranulation, oxidative burst or the release of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) also called netosis (1, 2). NETs are released by activated PMN in response to various pathogens (bacteria, fungi, virus, protozoa) ((1, 3-6) and reviewed in (7, 8)) but also in response to endogenous mediators of inflammation (3, 9) and pharmacological agents such as phorbol myristate acetate (PMA) or calcium ionophore (1, 3, 4, 10, 11). Netosis was initially described as a suicide-like mechanism, but the concept of vital netosis is also emerging (12). NETs are constituted by extracellular chromatin decorated by various granule-derived and cytoplasmic proteins. Histones are the most abundant (70% of the total proteins (6)) but several important mediators of the immune response are also present, such as elastase, lactoferrin, calprotectines or LL-37 (reviewed in (7)).

To date, the best known function of NETs is to trap pathogens, thus limiting their dissemination and exposing them to high local concentrations of various molecules immobilized on their chromatin backbone ((1, 11, 13) and reviewed in (8, 14)). However, accumulation of NETs is associated to adverse effects to the host, demonstrated *in vitro* and *in vivo*, such as epithelial and endothelial cell injury (4, 13, 15-18) as well as thrombi formation (19) ((20, 21) (22) and reviewed in (7, 14, 23, 24)). Moreover, by exposing self-antigens NETs can initiate autoimmune responses as recently evidenced during small vessel vasculitis, rheumatoid arthritis, type 1 diabetes or systemic lupus erythematosus (SLE) (15, 25) (26) (27-29). In particular, during SLE, the association of self DNA with some PMN proteins (LL-37, cathepsin G, elastase or SLPI) induces IFN $\alpha$  production by plasmacytoid dendritic cells (pDCs) (30-34); This pDC/NETs/IFN $\alpha$  axis seems thus to constitute an amplification loop of major importance in SLE pathogenesis (18, 31, 32) and is an example of how NETs can

modulate DC functions *in vivo*. When forming complexes with RNA, these PMN proteins are able to activate myeloid DC (30, 32-34).

The role of PMN on DC function represents a new field of investigations of growing interest (reviewed in (35, 36)) and has been evaluated using blood PMN or PMN-derived purified mediators. Indeed, activated PMN can promote DC migration (37, 38) (reviewed in (39)) and can also modulate DC maturation and activation either through cell-cell contact (40), ectosomes (Turbica et al, submitted for publication) or through secreted mediators. Interestingly, several purified granule-derived mediators, such as lactoferrin, LL-37, calprotectins,  $\alpha$ -defensins, elastase, bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), myeloperoxidase (MPO) or proteinase 3 (PR3) have been described to down-regulate (41-46) or up-regulate (43, 47-51) DC functions, depending on the studies.

As far as NETs are concerned, a few studies have evaluated their potential effects on some antigen-presenting cells (APCs). Activated PMN bearing NETs can stimulate TNF $\alpha$  and IL-8 release by THP-1 cells (9). NETS recovered after micrococcal nuclease treatment of activated PMN can increase IL-1 $\beta$  and IFN $\alpha$  productions by LPS-activated macrophages (52) (31, 32). In an *in vivo* murine model of autoimmune vasculitis, inflammatory PMN recovered from mice skin exudates spontaneously produce NETs that activate bone marrow-derived DCs and transfer PMN-derived self-antigens to these cells (25). Altogether, these few reports rather suggest a pro-inflammatory effect of NETs on APCs. However, recently, an immunological silent clearance of NETs has been proposed (53); in this study, NETs isolated by pipetting do not directly activate resting macrophages, but can increase their LPS-induced activation (53).

The potential effects of NETs on APC modulation *in vitro* are thus poorly understood. The various and even controversial effects documented in the literature might be related to technical variations in NET preparations and APC model. In particular, the pro-inflammatory

effects of NETs on APCs were observed using whole activated or primed PMN (9, 25, 52). In the present study, we therefore evaluated the effects of isolated NETs on monocyte-derived DC (moDC) activation and maturation. As previously described, functional and large fragments of NETs were prepared from human fresh blood using the restriction enzyme Alu I (10). We found that these NETs downregulated the LPS-induced moDC maturation, as shown by the modulations of cell-surface marker expressions and cytokine production but did not affect their migration capacity. However, these NET-treated mature moDC displayed a decreased ability to activate CD4<sup>+</sup> T lymphocytes proliferation and favoured a Th2 polarization. These results thus evidence a new and important role for PMN in the regulation of both innate and adaptive immunity, via the NET numerous active components which interact with moDC.

## **Materials and Methods**

### *Reagents and antibodies*

Calcium ionophore A23187, lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* serotype O55:B5, dexamethasone, tetanus toxine C fragment (TT) from *Clostridium tetani*, and phorbol myristate acetate (PMA) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Imiquimod (R848) was from Invivogen (Toulouse, France). Fluorescein isothiocyanate-, phycoerythrin (PE)-, PE-Cy7-, or allophycocyanin (APC)-conjugated monoclonal antibodies against human CD4, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CD4, CCR5, CCR7, CXCR4 and their respective isotype controls were from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) was from Molecular Probes, DNase I and Alu I from New England Biolabs (Evry, France) and recombinant human (rh) TNF $\alpha$  from Pharmingen, BD Biosciences.

### *Cell isolation*

PMN, peripheral blood mononuclear cells (PBMC), monocytes and CD4<sup>+</sup> naïve T lymphocytes were isolated from healthy donor's peripheral blood provided by the Etablissement Français du Sang (Rungis, France). To isolate PMN, erythrocytes were first removed by sedimentation of whole blood on 5% Dextran T500<sup>®</sup> (Pharmacia, Uppsala, Sweden) in 0.9% saline at a ratio 4:1. Leukocytes were recovered and PMN were isolated by centrifugation on lymphocyte separation medium (Eurobio, Les Ulis, France). Contaminating erythrocytes were removed by hypotonic lysis, and PMN (consistently > 95%) were resuspended in Hank's buffered salt solution (HBSS) (Gibco Life Technologies, Saint Aubin, France) supplemented with 0.5% fetal calf serum (FCS) (PAA, Les Mureaux, France) and 10 nM HEPES (Gibco). PBMC were obtained from whole blood after centrifugation on

lymphocyte separation medium. Monocytes were isolated from PBMC by magnetic bead cell sorting of CD14<sup>+</sup> cells (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). The CD14 negative fraction was kept for allogeneic T cell proliferation assays. Naïve CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were also isolated from this fraction by means of negative selection with the MACS naïve CD4 isolation kit II (Miltenyi Biotech) to carry antigen-specific T cell proliferation assays and polarization experiments. Total and naïve CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were confirmed to have purity greater than 95% based on CD4 or on CD4 and CD45RA expressions, respectively, by flow cytometry.

#### *Netosis activation and isolation of NETs*

NETs were produced and isolated as previously described (Barrientos 2013). Briefly, freshly isolated PMN were seeded in 12-well culture plates ( $1.5 \times 10^6$  cells/well) and stimulated with 5  $\mu$ M A23187 during 3 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Wells were carefully washed twice with 1 mL PBS and then treated during 20 min at 37°C with 20 U/ml of the restriction enzyme Alu I in HBSS (Barrientos et al, 2013), in order to recover soluble, large NETs fragments. Supernatants were collected and centrifuged at 300xg, 5 minutes at 4°C, to remove contaminating cells and debris. NET preparations were then pooled, aliquoted and stored at -20°C until use. DNA was quantified in NET samples by the PicoGreen® method (Molecular Probes) as previously described.

#### *Generation of human monocyte-derived dendritic cells (moDC) and LPS activation in the presence of NETs*

Monocytes ( $2 \times 10^6$ /ml) were cultured during 5 days in RPMI 1640 Glutamax supplemented with 10 % decompemented FCS, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 550 IU/ml rhGM-CSF and 550 IU/ml rhIL-4 (R&D Systems, France). On

day 5, flow cytometric analysis confirmed the generation of non-activated moDC with the following phenotype: CD14<sup>neg</sup>, DC-SIGN<sup>pos</sup>, CD1a<sup>pos</sup>, CD83<sup>neg</sup> CD86<sup>low</sup> (FACS Calibur flow cytometer and Cell Quest software (BD Biosciences)). These moDC ( $1 \times 10^6$  / mL) were washed and incubated with or without NETs (100 ng/mL ADN) in the absence of FCS during 30 minutes, before adding FCS with or without LPS (25 ng/mL) to the culture medium. After 24 hours, unless otherwise specified, cells and supernatants were recovered. moDC maturation was evaluated by both quantifying released cytokines, as indicated bellow, and by analyzing expressions of HLA-DR, CD40, CD80 and CD86, by flow cytometry. Phenotypic results were expressed as relative mean fluorescence intensity (RFI) corresponding to mean fluorescence intensity (MFI) of the evaluated marker / MFI of the isotype control. Expression of CCR5, CCR7 and CXCR4 was analysed using a LSR-Fortessa cytometer and results displayed in MFI. In some experiments, DNA backbone of NETs was dismantled by a 10 U/mL DNase treatment with I during 20 min. at 37°C, before adding moDC. In another set of experiments, moDC were activated with R848 a TLR7/TLR8 ligand (10 µg/mL) or PMA (300 nM) instead of LPS.

#### *RNA isolation and real time PCR of cytokines in moDC*

Total RNA of moDC ( $1 \times 10^6$  cells per condition) was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, Grand Island, NY) and cDNA was synthesized from 1 µg of RNA using oligo-dT primers and the AMV reverse transcriptase (Promega, Lyon, France), following manufacturer's protocols. Gene specific transcripts were amplified using the SYBR Green technology on a Biorad CFX96 system. Each reaction was performed with 4 ng cDNA, 0.5 µM of each forward and reverse primers and Sso Advanced SYBR green Supermix (Biorad, Marnes la Coquette, France) in a 10 µL final volume. After 30 s at 95°C and 44 cycles of amplification (95°C for 5 s, 60°C for 5 s) a melting-curve reaction was performed

from 65 °C to 95 °C to confirm the presence of single amplification product. For each target gene a threefold serial dilutions of pooled cDNA was analyzed to calculate the amplification efficiency (E). The relative amount of target mRNA was determined using the cycling threshold method ( $((1+E)^{-\Delta\Delta C_t})$ ), where E is the amplification efficiency. Ratio of every target gene threshold value to the geometric average of the reference genes (*ACTB* and *GAPDH*) threshold value was calculated for each sample. Results were expressed as relative gene expression corresponding to ratio of the former calculated value for a given sample to this value for the non-activated sample. Primer sequences for *IL1B*, *IL-6*, *IL10*, *IL-23A* (54) and *TNF* (55) were published elsewhere. Sequences for other primers were as follows : *IL8* [5'-TCTCTTGGCAGCCTTCCTGA-3' and 5'-TGGGGTGGAAAGGTTTGGAG-3'] , *ACTB* [5'-GGCATCCTCACCTGAAGTA-3' and 5'-GCACACGCAGCTCATTGTAG-3'], and *GAPDH* [5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' and 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'].

#### *Quantification of effector and tolerogenic moDC genes*

Total RNA was extracted from moDCs using RNeasy mini kits and the Qiacube robot (Qiagen, Courtaboeuf, France); cDNAs were obtained using TaqMan reverse transcription reagents (Applied Biosystems). Messenger RNA expression was evaluated by quantitative PCR on a 7900HT real-time PCR system (Applied Biosystems) with predesigned Taqman gene expression assays and reagents, according to the manufacturer's instructions. The expression of the following genes was assessed: glucocorticoid-induced leucine zipper (*GILZ*) (Hs00608272\_m1), complement component C1q (*CIQA*) (Hs00381122\_m1), cathepsin C (*CATC*) (Hs00175188\_m1), myxovirus resistance 1 (*MX1*) (Hs00895608\_m1), normal mucosa of esophagus specific 1 (*NMES1*) (Hs00260902\_m1), stabilin 1 (*STAB1*) (Hs01109068\_m1), retinaldehyde dehydrogenase 1 (*RALDH1*) (Hs00167445\_m1). Data were interpreted for each target gene in comparison with endogenous *ACTB* (Hs99999903\_m1) as a

control. The relative amount of target genes in each sample was calculated in comparison with the calibrator sample (untreated sample) using the cycling method threshold explained above.

#### *Degradation of TNF $\alpha$ by NETs*

A fixed amount of TNF $\alpha$  issued from rhTNF $\alpha$  or from pooled LPS-activated moDC supernatants, at a final volume of 40  $\mu$ L, were incubated with increasing concentrations of NETs (0, 10, 30, 100 or 300 ng/mL of DNA) during 24 hours. Samples were tested for TNF $\alpha$  by ELISA as described below.

#### *Chemotaxis assay of moDCs*

Chemotaxis was performed using a Transwell assay upon CCL19 or CXCL12 induction. Briefly,  $1 \times 10^5$  moDCs were resuspended in 150  $\mu$ L RPMI medium supplemented with 20 mM HEPES / 0.2% Human serum and were added to the upper chamber of a 6.5-mm diameter, 5- $\mu$ m pore polycarbonate Transwell culture insert (Corning costar, Brumath, France). The same media (600  $\mu$ L) with or without CCL19 (1, 10 or 50 nM) or CXCL12 (50 nM) (both from R&D Systems, France) diluted at various concentrations was placed in the lower chamber. AMD3100 (Sigma-Aldrich) was used at 10  $\mu$ M to inhibit CXCR4-dependent signaling. Input moDCs that migrated to the lower chamber after 3-hour incubation at 37°C in humidified air with 5% CO<sub>2</sub> were collected and counted by flow cytometry using a LSR-Fortessa. For analysis, cells were gated on forward (FSC) and side (SSC) scatter to remove debris. Then FSC-W/A and SSC-W/A were selected respectively to gate single and viable cells. The fraction of moDCs migrating across the polycarbonate membrane was calculated as follows: [(number of cells migrating to the lower chamber in response to chemokine or medium)/(number of cells added to the upper chamber at the start of the assay)]  $\times$  100.

### *T lymphocyte proliferation and polarization in response to moDC*

The capacity of moDC to activate CD4<sup>+</sup> lymphocytes was evaluated using two different approaches: the activation of allogeneic CD14<sup>neg</sup> PBMCs and the activation of autologous toxin-tetanic (TT)-specific CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. In both approaches, CD14<sup>neg</sup> PBMCs or CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, respectively, were first labelled with 5  $\mu$ M CFSE, following manufacturer's specifications. In the first approach, moDC were incubated with  $1.5 \times 10^5$  CD14<sup>neg</sup> PBMCs from allogeneic or autologous donors at a ratio moDC:PBMC of 1:3 or 1:9, in RPMI 1640 Glutamax supplemented with 10% AB human serum (Sigma), in round-bottomed 96 well plates, in triplicate. On day 6, cells were labeled with propidium iodide (PI) and with an APC-labelled anti-CD4 antibody. Proliferation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes was analyzed by flow cytometry (CD4<sup>+</sup> PI<sup>neg</sup> cells). In the second approach, we evaluated the activation of antigen specific lymphocytes. Autologous CD4<sup>+</sup> T lymphocytes ( $1 \times 10^5$ ) were co-incubated with moDC previously loaded or not with TT (0.2  $\mu$ g/mL) along the LPS activation process (ratio moDC:lymphocyte of 1:10 and 1:3). At day 6, cells were stained with PI and analyzed by flow cytometry. Proliferation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes proliferation was expressed as the percentage of CFSE low PI negative cells in the sample.

To assess T lymphocyte polarization, moDCs were co-cultured with allogeneic naive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (ratio moDC:T lymphocytes 1:10) during 5 days. Supernatants were then analyzed for cytokine release.

### *Cytokine quantification in moDC and moDC/T lymphocyte culture supernatants*

The supernatants of moDC were assayed for IL-6, IL-8, IL-10 and TNF $\alpha$  by cytometric bead array (CBA, BD Biosciences) (detection limit 7.2 pg/mL). IL-23 was quantified by ELISA with the ready-SET-Go kit from e-biosciences (San Diego, CA) (detection limit 15 pg/mL). In

some experiments, TNF $\alpha$  was quantified by ELISA using the optEIA set from BD Biosciences (detection limit 7.8 pg/mL). Quantification of IL-12p70 was performed using the Quantitikine reagent kit (R&D Systems) (detection limit 5 pg/ml). The supernatants of moDC/naïve CD4<sup>+</sup> T lymphocytes co-cultures were analyzed for IFN $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 and IL-17A using a human cytokine bead kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and a Magpix system (Luminex, Austin, TX) (sensitivity 0.08 - 1.01 pg/mL).

### *Statistical analysis*

The non-parametric analysis by Wilcoxon matched pairs test was performed using GrapPad Prism software. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. The non-parametrically analysis by the Mann–Whitney U-test (Prism software, GraphPad, La Jolla, CA) was performed for Chemotaxis assay. *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant.

## Results

### *NETs downregulate moDC maturation*

A few recent studies have shown that whole PMN having undergone netosis (9, 25) or supernatants of activated PMN containing NETs (31, 52) can modulate some DC functions. Here, we wanted to evaluate the effects of isolated NETs on moDC. For this, we first sheared NETs associated to A23187-activated PMN using the restriction enzyme Alu I, thus recovering large NETs fragments in fresh HBSS medium, as previously described (10).

We then tested if these NETs could modify moDC phenotype either directly or during LPS-induced activation. moDCs were pre-incubated with NETs (100 ng/mL ADN) for 30 minutes in the absence of FCS, to avoid NET dismantling by serum DNases (56). Then, culture medium was supplemented with FCS and LPS was added or not. After 24 hours, the expression of classic moDC maturation markers was quantified. Figure 1A shows that the expressions of HLA-DR, CD40, CD80 and CD86 were not modified by NETs alone. In contrast, the LPS-induced upregulation of these four molecules was significantly decreased when moDC were pre-treated by NETs (Fig1A). The average of the percentage decrease was 30% for HLA-DR and CD40 and 20% for CD80 and CD86.

We also evaluated cytokine release in moDC supernatants during the same experiments. NETs alone did not trigger cytokine release by moDCs (data not shown). In contrast, NETs downregulated the LPS-induced cytokine production by moDCs. Indeed, the presence of NETs was associated to a 10% decrease of IL-8 and, interestingly, of more than 50 % for TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12p70 and IL-23 (Fig. 1B). These homogenous results allowed us to focus on one single cytokine determination in the subsequent experiments. We chose to evaluate TNF $\alpha$  production because it is the earliest expressed cytokine during inflammation (57) and because its modulation could thus represent the initial effect of NETs.

Since the restriction enzyme Alu I cannot be removed from the NET preparations, we performed a set of control experiments and found that Alu I did not modify the LPS-induced TNF $\alpha$  production (Fig. 1C). In addition, the integrity of NET structure does not seem to be required, as dismantling their DNA backbone with DNase I did not reverse the observed NET effect on TNF $\alpha$  downregulation (Fig. 1C). Finally, the downregulating effect of NETs on moDC activation was not restricted to LPS activation, as a significant decreased TNF $\alpha$  production was also found when moDC were pre-incubated with NETs before stimulation with R848 or PMA (Fig. 1D).

Together, this first set of data suggests that NETs isolated by Alu-I digestion downregulate moDC maturation induced by a TLR4 agonist (LPS) at the level of both surface phenotype and cytokine secretion. This regulatory effect of NETs is also observed when moDC are stimulated by a TLR7/8 agonist (R848) or PMA.

*The anti-inflammatory effect of NETs entails reduced cytokine gene transcription.*

To further examine the effect of NETs on decreasing cytokine release by LPS-activated moDCs, we evaluated the kinetics of gene transcription for *TNF*, *IL1B*, *IL6*, *IL8*, *IL10* and *IL23A*. In response to LPS, the accumulation of mRNA from the aforementioned cytokine genes was maximal at 2 hours, except for *IL8* and *IL10* that exhibited a peak at 4 hours (Fig. 2A). In the presence of NETs, the kinetics of mRNA accumulation was similar (with a pick at 2 or at 4 hours, respectively). However, the relative amount of mRNA at the transcription pick was significantly decreased, dropping by 30% for *TNF* and *IL8*, by 45% for *IL1B*, *IL6* and *IL23A* and by 70% for *IL10*. These data suggest that NETs re-program moDC reducing their

potential to produce cytokines at a protein level but also at a transcriptional level under inflammatory conditions.

*NETs drive LPS-induced mature moDC towards an effector phenotype*

To further explore this effect of NETs, we investigated if they were driving LPS-activated moDCs towards a tolerogenic phenotype. Thus we quantified the expression of *NMES1* and *MX1* genes associated to type 1 DC (DC1), and *CIQA*, *CATC*, and *GILZ* associated to tolerogenic DC (DCreg) as recently described by Zimmer et al. (Zimmer et al, 2012). Concerning DC1-associated genes, we found that NETs alone did not induce any significant change in their expressions as compared with non-stimulated moDC. As expected, LPS upregulated the expression of *MX1* and *NMES1*. The presence of NETs during LPS-activation reinforced the DC1 effector phenotype, as evidenced by an increased expression of *NMES1* and *MX1* genes (Fig 2B). Alternatively, a decrease of DCreg markers was observed on LPS-activated moDC even when NETs were present along the activation process (Fig. 2B). As a control, DEX-treated moDC significantly up-regulated the expression of these genes. Altogether, these data suggest that NETs do not induce a DCreg gene profile. Conversely, they might enhance the level of a group of effector genes on LPS-activated moDC.

*NET-induced downregulation of TNF $\alpha$  release is not related to an indirect effect on LPS or TLR4, nor on TNF $\alpha$  stability.*

In order to document potential indirect effects of NETs, some control experiments were performed using TNF $\alpha$  release as readout.

First, moDCs were activated with LPS for 5, 30 and 120 min; after one washing step, NETs were added and TNF $\alpha$  was assayed in the 24 hours-culture supernatants. As expected, a time-dependent effect of LPS was evidenced (Fig3A). Interestingly, this time-course was

maintained if NETs were added after LPS stimulation, but TNF $\alpha$  levels were always significantly lower (Fig3A). These results suggest that NET-induced downregulation on TNF $\alpha$  release might not be related to a potential physical sequestration of LPS by NETs or to a potential blockage of TLR4 by NETs hindering LPS ligation . We also conclude that NETs can negatively modulate an already engaged activation of moDC by LPS.

Second, we evidenced that NETs did not induce TNF $\alpha$  retention on moDC cell surface or inside the cells. Indeed, when TNF $\alpha$  (both membrane-associated and intracellular) was quantified by flow cytometry on permeabilized cells , very low and identical expressions were observed on LPS-activated moDC in the absence or in the presence of NETs (data not shown).

Finally, we also tested the hypothesis that NET proteases could directly degrade TNF $\alpha$ . For this purpose, 500 pg of rhTNF $\alpha$  (Fig. 3B) or LPS-activated moDC supernatants containing 300 pg of native TNF $\alpha$  (Fig. 3C) were incubated for 24hours in the presence or not of increasing amounts of NETs (from 10 to 300 pg/mL DNA), before TNF $\alpha$  assay. In both cases, TNF $\alpha$  levels were not modified by the added NETs, whatever their concentrations. Therefore, we can conclude that in our experimental conditions NETs, in particular NET-associated proteases, do not seem to directly degrade TNF $\alpha$ .

All together, these results suggest that the downregulation of NETs on cytokine release by LPS-stimulated moDC might not be related to LPS sequestration, to TLR4 hindrance, to intracellular or membrane cytokine sequestration, or to extracellular cytokine degradation.

#### *NETs do not impact the in vitro migratory capacity of mature moDC*

The next step was to analyze the consequences of NETs on rapid and coordinated switch in chemokine receptor expressions during DC maturation and on migration capacity. We first

quantified by flow cytometry the membrane expressions of CCR5, CCR7 and CXCR4 which are involved in DC maturation and homing to lymph nodes. As expected, CCR5 expression was high on immature moDC and strongly down-regulated upon LPS activation (Fig. 4A). In contrast, CCR7 and CXCR4 were barely detectable on immature moDCs and were upregulated on mature moDCs. Surprisingly, the presence of NETs during moDC maturation did not modulate the expression of CCR5, CCR7 and CXCR4 (Fig. 4A). Then, we compared the *in vitro* CXCL12 (CXCR4 ligand) or CCL19 (CCR7 ligand)-induced migration of unstimulated or LPS-activated moDC in the presence or not of NETs using a Transwell-based chemotaxis assay. In line with the pattern of receptor expression, the addition of CXCL12 or CCL19 stimulated LPS-activated moDC migration across the Transwell membrane, resulting in bell-shaped dose-response patterns whereas immature moDC poorly migrated (Fig. 4B). When moDC were pre-treated with NETs prior to LPS activation, no significant alteration of moDC migration was observed in response to both chemokines. The migration of moDC upon CXCL12 exposure was totally inhibited by the specific CXCR4 antagonist AMD3100. Overall, these findings suggested that, in the presence of NETs, moDC capacity to migrate, in particular to lymphoid chemokines, is maintained.

#### *NETs weaken CD4<sup>+</sup> T Lymphocyte proliferation induced by LPS-treated moDC*

To better document the consequences of NETs on moDC functions, we evaluated the capacity of these cells to activate CD4<sup>+</sup> T lymphocytes proliferation. In a first experimental setting, LPS-activated moDC, treated or not with NETs, were coincubated with autologous or allogeneic monocyte-depleted PBL loaded with CFSE. Proliferation was evaluated on day 6 as the percentage of CD4<sup>+</sup> cells with low CFSE signal. As a control of proliferation, activation of PBL with PHA resulted in more than 50 % of CFSE<sup>low</sup> cells whereas, in the absence of any stimulus, less than 2 % PBL were CFSE<sup>low</sup> (Fig. 5A). LPS-activated moDC

induced a dose-dependent proliferation of autologous CD4<sup>+</sup> cells, generating in all cases less than 20 % CFSE<sup>low</sup> cells. No significant differences were observed in the CD4<sup>+</sup> cell proliferation induced by autologous moDC matured in the presence of NETs. Under allogeneic conditions, LPS-activated moDC induced a strong proliferation of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte, with 67.6 ± 9.2 % and 46.6 ± 6.3% of total cells being CFSE<sup>low</sup> at the ratio moDC:PBL of 1:3 and 1:9, respectively. Instead, moDC matured in the presence of NETs significantly decreased the proliferation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, with 35.2 ± 4.7 % and 26.1 ± 3.5% CFSE<sup>low</sup> cells recovered, respectively. These results suggest that NETs can decrease the capacity of LPS-treated moDC to activate the proliferation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in an allogeneic reaction.

We also tested the proliferation of antigen-specific autologous T lymphocytes (Fig 5B). Purified CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were co-cultured with LPS-activated moDC loaded with TT. At day 6 of co-culture, in the absence of antigen and independently of NET pretreatment, less than 20% of total cells were CFSE<sup>low</sup>. Conversely, in the presence of TT, 37.9 ± 8.1% and 23.8 ± 3.1% of recovered cells were CFSE<sup>low</sup> (moDC:T lymphocyte ratio 1:10 and 1:30, respectively). In accordance with the results found in the allogenic reaction, moDC matured in the presence of NETs led to a significantly decreased proliferation of TT-specific CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, with 21.8 ± 7.4 % or 14.1 ± 5.7 % of CFSE<sup>low</sup> cells recovered in the two moDC:T lymphocyte tested ratios.

This set of results indicates that NETs downregulate the capacity of mature moDC to activate autologous and allogeneic CD4<sup>+</sup> T cell proliferations.

*NETs drive LPS-induced mature moDC to promote IL-4/IL-5/IL-13 producing CD4<sup>+</sup> T cells*

In order to unravel the type of effector moDCs (i.e. DC1, DC2 or DC17) induced by NETs, we analyzed the polarization of naïve allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells co-cultured with moDCs. To

this aim, moDCs were first incubated for 24 h with either medium alone, NETs, LPS, or NETs plus LPS, then washed and co-cultured with allogeneic naïve CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. Th polarization was analyzed after 5 days by quantifying cytokines in the culture supernatants (Fig 6). NETs alone did not induce any cytokine production as compared with medium alone. As expected, LPS treated-moDCs induced the secretion of the different tested cytokines, IFN $\gamma$  being strongly produced. When moDCs were pre-treated with NETs, a trend towards a downregulation of IFN- $\gamma$ , IL-17A and IL-10 release was observed, together with an up-regulation of IL-4, IL-5 and IL-13 productions. Together, these results suggest that NETs could favor the capacity of LPS-activated moDC to activate effector Th2 responses and reduce the polarization towards Th1 or Th17 phenotypes.

## Discussion

The understanding of NET properties is one of the main goals in dissecting this PMN function. In the present study, we documented a regulatory effect of NETs on DC maturation and activation. In the presence of NETs, DC surface activation markers and cytokine productions were downregulated leading to a decreased efficiency of mature DC to activate antigen-specific and allogeneic CD4<sup>+</sup> T lymphocyte proliferations. Moreover, NET-treated DC seemed to modify naïve CD4<sup>+</sup> polarization, enhancing Th2-related cytokine release. Interestingly, DC migration capacity towards chemokines was not modified in the presence of NETs.

Although PMN are well known as pro-inflammatory cells, during the last few years has emerged the concept that PMN also participate to the regulation of inflammation. Such a property was first identified when evidencing the engagement of a resolution phase after the elimination of the insulting agent. Local PMN move their metabolism toward a pro-resolutive one thus allowing the end of the ongoing inflammatory response and the beginning of tissue repair. PMN apoptosis also participate to the regulation of inflammation (reviewed in (58)). Several antimicrobial molecules such as LL-37, lactoferrine or  $\alpha$ -defensins can induce (43, 47, 50, 59) or decrease DC activation (43, 60, 61) (59) depending on stimulation conditions. In addition, elastase is able to induce regulatory DC, via TGF- $\beta$  (42), CD4<sup>+</sup> T reg lymphocytes differentiation (44) or decreased pro-inflammatory cytokines (41). In mice, PMN-derived IL-10 reduces the inflammatory response of DCs (62). More recently, myeloperoxidase has been identified as an inhibitor of DC activation and function *in vivo* and *in vitro*, leading to a decreased adaptive immune response (63). Moreover, PMN-derived ectosomes, induce the production of TGF- $\beta$  by immature mo-DCs and downregulate the LPS-induced DC maturation (64). Finally, PMN have been shown to directly inhibit T lymphocyte activation, in particular through L-arginine deprivation in culture cell medium (65).

Examining the effects of NETs, our results give new insights into this concept of regulatory PMN. However, previous reports have documented some pro-inflammatory effects of NETs on APCs and phagocytes. Different experimental conditions can explain these differences. Two studies were done by co-incubating THP-1 cells or bone marrow derived DCs with whole activated- PMN (9, 25). Another one was using primed macrophages incubated with NETs recovered by MNase digestion of activated PMN (52). And the last study was done using pDCs and NETs obtained from SLE patients (31). In all these studies, NETs were partially isolated and the preparations might contain various cytokines or PMN-derived proteins also able to activate DC. Interestingly, some authors recently showed that NETs recovered by extensive pipetting of activated PMN supernatants could not activate macrophages, in accordance with our results, but they could enhance the pro-inflammatory response of LPS-activated macrophages (53).

The mechanisms involved in the decreased activation capacity of DC in the presence of NETs remains to be better understood. Our results show that this effect is still observed when adding NETs after DC activation with LPS and washings, thus excluding the possible roles of indirect factors such as LPS trapping, or TLR4 access blocking as already reported for other PMN proteins. Indeed, lactoferrin or BPI, two NET-associated proteins (1), can sequester LPS and thereby inhibit its biological effect (45, 46). Moreover, lactoferrin, cathepsin G or elastase might alter the binding of LPS to TLR4 either by binding competition or by partial proteolysis of CD14 or TLR4 (48, 60, 66). Finally, our results also evidence that the regulatory effect of NETs is not limited to DC activation with TLR4 ligands but that it also observed when DCs are activated with a TLR7/TLR8 ligand or with PMA.

To explain the regulatory effect of NETs on LPS-activated DCs, we speculate that the active component might be a protein associated to NETs, rather than DNA. Indeed, our NET preparations were standardized upon DNA concentration, and we found that dismantling

NETs structure by DNase I did not reverse the regulatory effect of NETs. Among the proteins potentially involved in DC down-regulation, several granular-derived components present on NETs can be cited such as lactoferrin (60), LL-37 cathelicidine {Garcia-Romo, 2011 #31}, myeloperoxidase (63) or elastase (41, 67). Beside these possible candidates, nuclear proteins associated to NETs might also been involved. Histones are the most abundant proteins in NETs (6) but their effect on DC activation has not yet been reported, even their citrullinated form. Histone cytotoxic effect on endothelial and epithelial cells has been reported (4, 17, 18) that was not observed on DCs in our experimental settings. Another candidate might be an important alarmin, the high-mobility group box 1 (HMGB1), known to be present on NETs (31) and able to activate DC (68) or induce tolerance (69).

The functional consequences of DC maturation downregulation by NETs were then documented. We first examined the recently described molecular signature of effector and regulatory DCs (70). Although NETs downregulated moDC maturation in response to LPS, these DCs did not exhibit any increase in pan-regulatory DC markers (C&QA, CATC and GILZ genes) but rather expressed high levels of effector markers (Mx1 and NMES1 genes). We then found that NETs did not modify LPS-induced chemokine receptors at DC surface or their migration capacity *in vitro* towards CCL19 and CXCR4. We can thus hypothesize that, *in vivo*, even after interaction with NETs at inflammatory sites, DCs maintain their migration capacity to lymph nodes, thus confirming an effector phenotype. Finally, we studied the effects of NET-treated DCs on T lymphocyte functions (proliferation and polarization). We first evidenced a decreased CD4+ T lymphocyte proliferation when these cells were exposed to DCs pre-incubated with NETs during maturation; both autologous and allogeneic proliferations were affected, antigen-specific or not. Our results performed with isolated NETs are different from those of Tillack et al who recently reported that netting-PMN directly induced T cell proliferation (71). The differences between both NET models might explain

these results. To investigate whether these effector DCs affect T cell polarization, cytokines were assayed in the coculture supernatants. We found that the CD4<sup>+</sup> T lymphocyte polarization induced by LPS-activated DCs was modified in the presence of NETs. Indeed, Th1 and Th17 polarizations seem to be decreased, in accordance with some recent findings reported by Doz et al; in a model of mycobacteria-infected DC, these authors evidenced a shut down in Th17 CD4 T cells in the presence of neutrophils (72). In contrast, Th2 polarization was rather enhanced. This effect could be related, at least in part, to the decreased IL-12 and IL-23 productions by moDC that we found. (reviewed in (73)). In some circumstances, PMN could selectively favour Th2 phenotype as documented *in vitro* by a decreased IFN $\gamma$  production by activated T lymphocytes (61) or, *in vivo*, in a recent bacterial infection model in PMN deficient mice (74). Here, we describe for the first time that NETs themselves could drive a Th2 response, reinforcing their potential role in regulating inflammation and inducing tissue repair. Among the NET constituents that might be involved in Th2 response, proteases are probably good candidates, as already described for several allergen serine proteases such as dust mite (75). ADN might also play a role, as it has been reported to trigger Th2 response in a mice model through IRF3 dependent mechanism (76). Finally, we can also suggest a role for HMGB1 present on NETs, as this protein is also known to induce Th2 response (77).

Altogether, the present results suggest that NETs carry PMN-derived mediators able to downregulate LPS-induced activation of moDC, leading to a decreased T lymphocyte proliferation and a probable Th2 polarization, but maintaining DC effector genotype and migration capacity. These newly described properties of NETs might be of importance *in vivo* to control the inflammatory response. A better understanding of the NET components implicated in this effect could help to further define the intriguing biology of NETs.

**Acknowledgments.**

This work was supported by a grant “Attractivité” from Université Paris-Sud.

## Figure legends

### **Figure 1. Effect of NETs on moDC cell-surface phenotype and cytokine secretion.**

Immature mo-DC (ns) were incubated or not in the presence of NETs, LPS or NET plus LPS (NET/LPS) as indicated in *Materials and Methods*. After 24 hours, the expression of different cell-surface markers was quantified by FACS analysis, gating out small size events (**A**), and the levels of secreted cytokines were assayed in cell culture supernatants (**B**). The activation of moDC with LPS was also evaluated (TNF $\alpha$  secretion) in the presence of either Alu I alone, NETs alone or NETs dismantled by DNase I treatment (**C**). In addition, moDC were also activated with R848 (100 ng/mL) or with PMA (300 nM) in the absence or in the presence of NETs (**D**). Data represent the cumulative results of 5 (**A** and **B**) or 3 (**C** and **D**) independent experiment. \* $p < 0,05$ .

### **Figure 2. Effect of NETs on the transcriptional profile of cytokines and regulatory genes.**

**A**) After preincubation or not with NETs during 30 minutes, moDC were activated with LPS for 2, 4 or 8 hours. The relative amount of mRNA for different cytokine genes was evaluated by qPCR as indicated in *Materials and Methods*. **B**) moDC were incubated in the presence of either dexamethasone (1  $\mu$ g/mL), NETs, LPS or NETs plus LPS during 24 hours. Relative gene expression of various genes associated to a pro-inflammatory or a regulatory profile (70) were analyzed. Results in **A** are representative of at least 4 independent experiments. Data in **B** are cumulative results of 3 independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

**Figure 3. NET-induced decreased TNF $\alpha$  production by moDC is not related to indirect effects.** **A)** moDC were first activated with LPS during the indicated times, washed and then incubated for 24 hours in the absence or in the presence of NETs; TNF $\alpha$  was quantified by ELISA in the culture supernatants. A fixed concentration of TNF $\alpha$ , either rhTNF $\alpha$  (**B**) or supernatants from LPS-activated moDC (**C**), was incubated with increasing concentrations of NETs, under moDC culture conditions. After 24 hours, the remaining TNF $\alpha$  was quantified by ELISA. \* $p < 0.05$ .

**Figure 4. NETs have no effect on the chemotactic potential of moDC.** **A)** Membrane expression of CCR5, CCR7 and CXCR4 on unstimulated or LPS-activated moDC in the presence or not of NETs was determined by flow cytometry using APC-CCR5, PE-Cy7-CCR7 and PE-CXCR4 mAbs. Background fluorescence is shown (shaded area). **B)** moDC were tested for their ability to migrate in response to the indicated concentration of chemokine. Inhibition of CXCR4-mediated chemotaxis by AMD3100 (10  $\mu$ M) added to both chambers is shown. Transmigrated cells recovered in the lower chamber were counted by flow cytometry. Data in **A** are representative of at least 3 independent experiments. Results (mean  $\pm$  SEM) in **B** are cumulative results of 3 independent experiments and expressed as the percentage of input total unstimulated or LPS-activated moDC in the presence or not of NETs that migrated to the lower chamber. \* $P < .05$ , \*\* $P < .005$  and \*\*\* $P < .0005$  compared with unstimulated moDC.

**Figure 5. NET effect on the capacity of moDC to activate T lymphocyte proliferation .** **A)** CFSE-loaded CD14 negative PBL were cultured with PHA, or with autologous (black symbols) or allogeneic (white symbols) moDC previously activated with LPS in the absence or in the presence of NETs. **B)** In another experiments, CFSE-loaded CD4<sup>+</sup> T lymphocytes

were incubated with autologous immature moDC (ns) or with moDC previously activated with LPS and NETs and loaded or not with Tetanus Toxine (TT). At day 6, the percentage of CFSE-low cell was determined by FACS analysis gating in CD4<sup>+</sup> PI negative cells, as described in *Materials and Methods*. Results Data are cumulative results of at least 3 independent experiments.\* $p < 0.05$ .

**Figure 6. NET effect on moDC-induced T Ly polarization** Naïve CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were co-incubated with moDC (both immature and LPS-treated) in the absence or in the presence of NETs. At day 5, cytokines were quantified in the co-culture supernatants using Luminex technology. Data shown are cumulative results of 4 independent experiments.

## References

1. Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y)* 303:1532-1535.
2. Mocsai, A. 2013. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of experimental medicine* 210:1283-1299.
3. Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* 176:231-241.
4. Marin-Esteban, V., I. Turbica, G. Dufour, N. Semiramoth, A. Gleizes, R. Gorges, I. Beau, A. L. Servin, V. Lievin-Le Moal, C. Sandre, and S. Chollet-Martin. 2012. Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain C1845 induces neutrophil extracellular traps that kill bacteria and damage human enterocyte-like cells. *Infection and immunity* 80:1891-1899.
5. Saitoh, T., J. Komano, Y. Saitoh, T. Misawa, M. Takahama, T. Kozaki, T. Uehata, H. Iwasaki, H. Omori, S. Yamaoka, N. Yamamoto, and S. Akira. 2012. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell host & microbe* 12:109-116.
6. Urban, C. F., D. Ermert, M. Schmid, U. Abu-Abed, C. Goosmann, W. Nacken, V. Brinkmann, P. R. Jungblut, and A. Zychlinsky. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS pathogens* 5:e1000639.
7. De Chaisemartin, L., G. Hayemb, and S. Chollet-Martin. 2013. When neutrophils cast their nets. *Joint Bone Spine* 80:124-126.
8. Papayannopoulos, V., and A. Zychlinsky. 2009. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in immunology* 30:513-521.
9. Keshari, R. S., A. Jyoti, M. Dubey, N. Kothari, M. Kohli, J. Bogra, M. K. Barthwal, and M. Dikshit. 2012. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PloS one* 7:e48111.
10. Barrientos, L., V. Marin-Esteban, L. de Chaisemartin, V. L. Le-Moal, C. Sandre, E. Bianchini, V. Nicolas, M. Pallardy, and S. Chollet-Martin. 2013. An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps. *Frontiers in immunology* 4:166.
11. Parker, H., and C. C. Winterbourn. 2013. Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Frontiers in immunology* 3:424.
12. Yipp, B. G., and P. Kubes. 2013. NETosis: how vital is it? *Blood*.
13. McDonald, B., R. Urrutia, B. G. Yipp, C. N. Jenne, and P. Kubes. 2012. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell host & microbe* 12:324-333.
14. Brinkmann, V., and A. Zychlinsky. 2012. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *The Journal of cell biology* 198:773-783.
15. Kessenbrock, K., M. Krumbholz, U. Schonermarck, W. Back, W. L. Gross, Z. Werb, H. J. Grone, V. Brinkmann, and D. E. Jenne. 2009. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature medicine* 15:623-625.
16. Narasaraju, T., E. Yang, R. P. Samy, H. H. Ng, W. P. Poh, A. A. Liew, M. C. Phoon, N. van Rooijen, and V. T. Chow. 2011. Excessive neutrophils and neutrophil

- extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *The American journal of pathology* 179:199-210.
17. Saffarzadeh, M., C. Juenemann, M. A. Queisser, G. Lochnit, G. Barreto, S. P. Galuska, J. Lohmeyer, and K. T. Preissner. 2012. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS one* 7:e32366.
  18. Villanueva, E., S. Yalavarthi, C. C. Berthier, J. B. Hodgins, R. Khandpur, A. M. Lin, C. J. Rubin, W. Zhao, S. H. Olsen, M. Klinker, D. Shealy, M. F. Denny, J. Plumas, L. Chaperot, M. Kretzler, A. T. Bruce, and M. J. Kaplan. 2011. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 187:538-552.
  19. Fuchs, T. A., A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D. D. Myers, Jr., S. K. Wroblewski, T. W. Wakefield, J. H. Hartwig, and D. D. Wagner. 2010. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:15880-15885.
  20. de Boer, O. J., X. Li, P. Teeling, C. Mackaay, H. J. Ploegmakers, C. M. van der Loos, M. J. Daemen, R. J. de Winter, and A. C. van der Wal. 2012. Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction. *Thrombosis and haemostasis* 109:290-297.
  21. Demers, M., D. S. Krause, D. Schatzberg, K. Martinod, J. R. Voorhees, T. A. Fuchs, D. T. Scadden, and D. D. Wagner. 2013. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:13076-13081.
  22. Doring, Y., H. D. Manthey, M. Drechsler, D. Lievens, R. T. Megens, O. Soehnlein, M. Busch, M. Manca, R. R. Koenen, J. Pelisek, M. J. Daemen, E. Lutgens, M. Zenke, C. J. Binder, C. Weber, and A. Zernecke. 2012. Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis. *Circulation* 125:1673-1683.
  23. Fuchs, T. A., A. Brill, and D. D. Wagner. 2012. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32:1777-1783.
  24. Saffarzadeh, M., and K. T. Preissner. 2013. Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection. *Current opinion in hematology* 20:3-9.
  25. Sangaletti, S., C. Tripodo, C. Chiodoni, C. Guarnotta, B. Cappetti, P. Casalini, S. Piconese, M. Parenza, C. Guiducci, C. Vitali, and M. P. Colombo. 2012. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* 120:3007-3018.
  26. Diana, J., Y. Simoni, L. Furio, L. Beaudoin, B. Agerberth, F. Barrat, and A. Lehuen. 2013. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nature medicine* 19:65-73.
  27. Liu, C. L., S. Tangsombatvisit, J. M. Rosenberg, G. Mandelbaum, E. C. Gillespie, O. P. Gozani, A. A. Alizadeh, and P. J. Utz. 2012. Specific post-translational histone modifications of neutrophil extracellular traps as immunogens and potential targets of lupus autoantibodies. *Arthritis research & therapy* 14:R25.
  28. Dwivedi, N., J. Upadhyay, I. Neeli, S. Khan, D. Pattanaik, L. Myers, K. A. Kirou, B. Hellmich, B. Knuckley, P. R. Thompson, M. K. Crow, T. R. Mikuls, E. Csernok, and

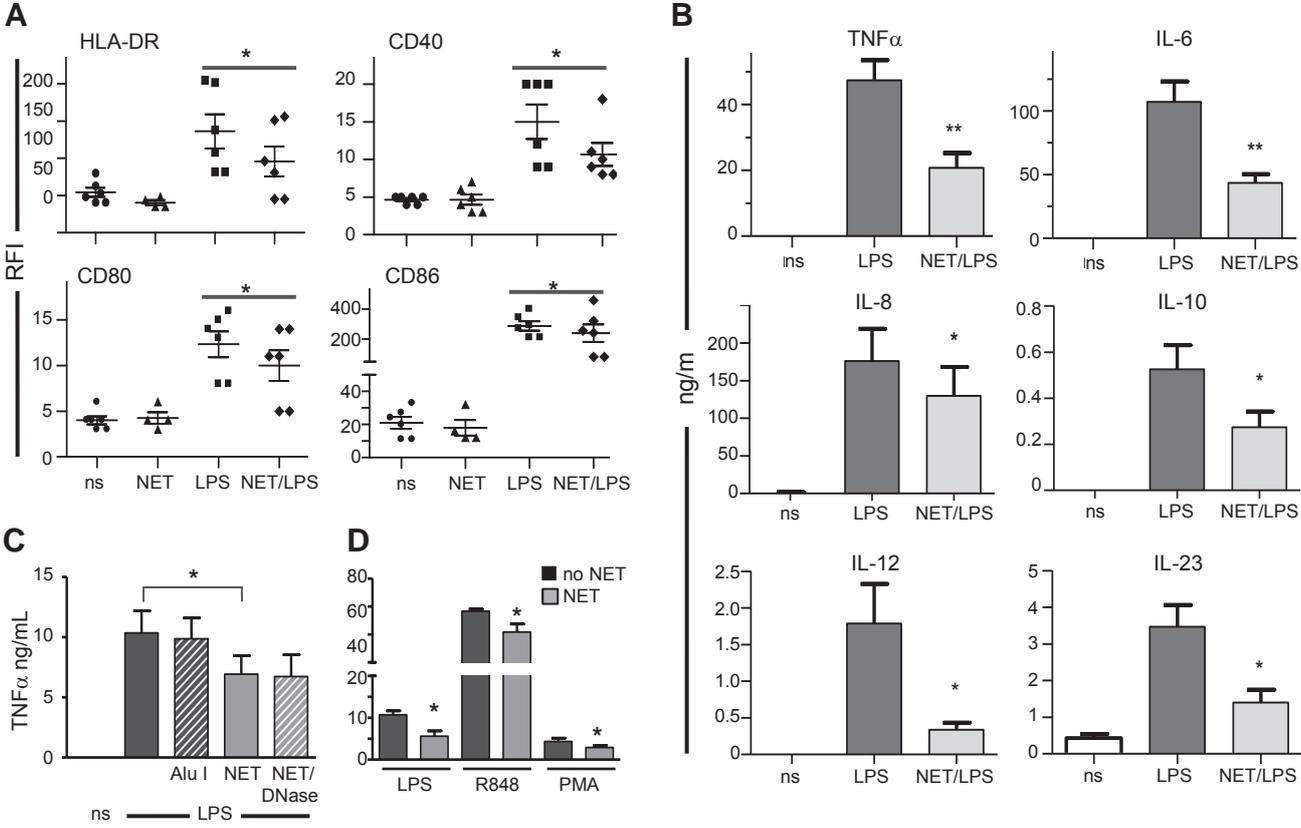
- M. Radic. 2012. Felty's syndrome autoantibodies bind to deiminated histones and neutrophil extracellular chromatin traps. *Arthritis and rheumatism* 64:982-992.
29. Pratesi, F., I. Dioni, C. Tommasi, M. C. Alcaro, I. Paolini, F. Barbetti, F. Boscaro, F. Panza, I. Puxeddu, P. Rovero, and P. Migliorini. 2013. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Annals of the rheumatic diseases*.
  30. Ganguly, D., G. Chamilos, R. Lande, J. Gregorio, S. Meller, V. Facchinetti, B. Homey, F. J. Barrat, T. Zal, and M. Gilliet. 2009. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *The Journal of experimental medicine* 206:1983-1994.
  31. Garcia-Romo, G. S., S. Caielli, B. Vega, J. Connolly, F. Allantaz, Z. Xu, M. Punaro, J. Baisch, C. Guiducci, R. L. Coffman, F. J. Barrat, J. Banchereau, and V. Pascual. 2011. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine* 3:73ra20.
  32. Lande, R., D. Ganguly, V. Facchinetti, L. Frasca, C. Conrad, J. Gregorio, S. Meller, G. Chamilos, R. Sebasigari, V. Ricciari, R. Bassett, H. Amuro, S. Fukuhara, T. Ito, Y. J. Liu, and M. Gilliet. 2011. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine* 3:73ra19.
  33. Lande, R., J. Gregorio, V. Facchinetti, B. Chatterjee, Y. H. Wang, B. Homey, W. Cao, Y. H. Wang, B. Su, F. O. Nestle, T. Zal, I. Mellman, J. M. Schroder, Y. J. Liu, and M. Gilliet. 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449:564-569.
  34. Skrzeczynska-Moncznik, J., A. Wlodarczyk, M. Banas, M. Kwitniewski, K. Zabieglo, M. Kapinska-Mrowiecka, A. Dubin, and J. Cichy. 2013. DNA structures decorated with cathepsin G/secretory leukocyte proteinase inhibitor stimulate IFN $\alpha$  production by plasmacytoid dendritic cells. *American journal of clinical and experimental immunology* 2:186-194.
  35. Schuster, S., B. Hurrell, and F. Tacchini-Cottier. 2013. Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. *Journal of leukocyte biology* 93:Epub ahead of print.
  36. van Gisbergen, K. P., T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2005. Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends in immunology* 26:626-631.
  37. Akahoshi, T., T. Sasahara, R. Namai, T. Matsui, H. Watabe, H. Kitasato, M. Inoue, and H. Kondo. 2003. Production of macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$  (MIP-3 $\alpha$ ) (CCL20) and MIP-3 $\beta$  (CCL19) by human peripheral blood neutrophils in response to microbial pathogens. *Infection and immunity* 71:524-526.
  38. Charmoy, M., S. Brunner-Agten, D. Aebischer, F. Auderset, P. Launois, G. Milon, A. E. Proudfoot, and F. Tacchini-Cottier. 2010. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania* major inoculation in resistant mice. *PLoS pathogens* 6:e1000755.
  39. Soehnlein, O., A. Zerneck, and C. Weber. 2009. Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins. *Thrombosis and haemostasis* 102:198-205.
  40. van Gisbergen, K. P., M. Sanchez-Hernandez, T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2005. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *The Journal of experimental medicine* 201:1281-1292.

41. Gresnigt, M. S., L. A. Joosten, I. Verschueren, J. W. van der Meer, M. G. Netea, C. A. Dinarello, and F. L. van de Veerdonk. 2012. Neutrophil-mediated inhibition of proinflammatory cytokine responses. *J Immunol* 189:4806-4815.
42. Maffia, P. C., S. E. Zittermann, M. L. Scimone, N. Tateosian, N. Amiano, D. Guerrieri, V. Lutzky, D. Rosso, H. E. Romeo, V. E. Garcia, A. C. Issekutz, and H. E. Chuluyan. 2007. Neutrophil elastase converts human immature dendritic cells into transforming growth factor-beta1-secreting cells and reduces allostimulatory ability. *The American journal of pathology* 171:928-937.
43. Rodriguez-Garcia, M., H. Oliva, N. Climent, M. M. Escribese, F. Garcia, T. M. Moran, J. M. Gatell, and T. Gallart. 2009. Impact of alpha-defensins1-3 on the maturation and differentiation of human monocyte-derived DCs. Concentration-dependent opposite dual effects. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 131:374-384.
44. Tateosian, N. L., R. M. Reiteri, N. O. Amiano, M. J. Costa, X. Villalonga, D. Guerrieri, and P. C. Maffia. 2011. Neutrophil elastase treated dendritic cells promote the generation of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T cells in vitro. *Cellular immunology* 269:128-134.
45. van Berkel, P. H., M. E. Geerts, H. A. van Veen, M. Mericskay, H. A. de Boer, and J. H. Nuijens. 1997. N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *The Biochemical journal* 328 ( Pt 1):145-151.
46. Wilde, C. G., J. J. Seilhamer, M. McGrogan, N. Ashton, J. L. Snable, J. C. Lane, S. R. Leong, M. B. Thornton, K. L. Miller, R. W. Scott, and et al. 1994. Bactericidal/permeability-increasing protein and lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. LPS binding properties and effects on LPS-mediated cell activation. *The Journal of biological chemistry* 269:17411-17416.
47. Bandholtz, L., G. J. Ekman, M. Vilhelmsson, E. Buentke, B. Agerberth, A. Scheynius, and G. H. Gudmundsson. 2006. Antimicrobial peptide LL-37 internalized by immature human dendritic cells alters their phenotype. *Scandinavian journal of immunology* 63:410-419.
48. Benabid, R., J. Wartelle, L. Malleret, N. Guyot, S. Gangloff, F. Lebargy, and A. Belaouaj. 2012. Neutrophil elastase modulates cytokine expression: contribution to host defense against *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia. *The Journal of biological chemistry* 287:34883-34894.
49. Csernok, E., M. Ai, W. L. Gross, D. Wicklein, A. Petersen, B. Lindner, P. Lamprecht, J. U. Holle, and B. Hellmich. 2006. Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway. *Blood* 107:4440-4448.
50. de la Rosa, G., D. Yang, P. Tewary, A. Varadhachary, and J. J. Oppenheim. 2008. Lactoferrin acts as an alarmin to promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses. *J Immunol* 180:6868-6876.
51. Vogl, T., K. Tenbrock, S. Ludwig, N. Leukert, C. Ehrhardt, M. A. van Zoelen, W. Nacken, D. Foell, T. van der Poll, C. Sorg, and J. Roth. 2007. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nature medicine* 13:1042-1049.
52. Kahlenberg, J. M., C. Carmona-Rivera, C. K. Smith, and M. J. Kaplan. 2012. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages. *J Immunol* 190:1217-1226.
53. Farrera, C., and B. Fadeel. 2013. Macrophage Clearance of Neutrophil Extracellular Traps Is a Silent Process. *J immunol*:[Epub ahead of print].

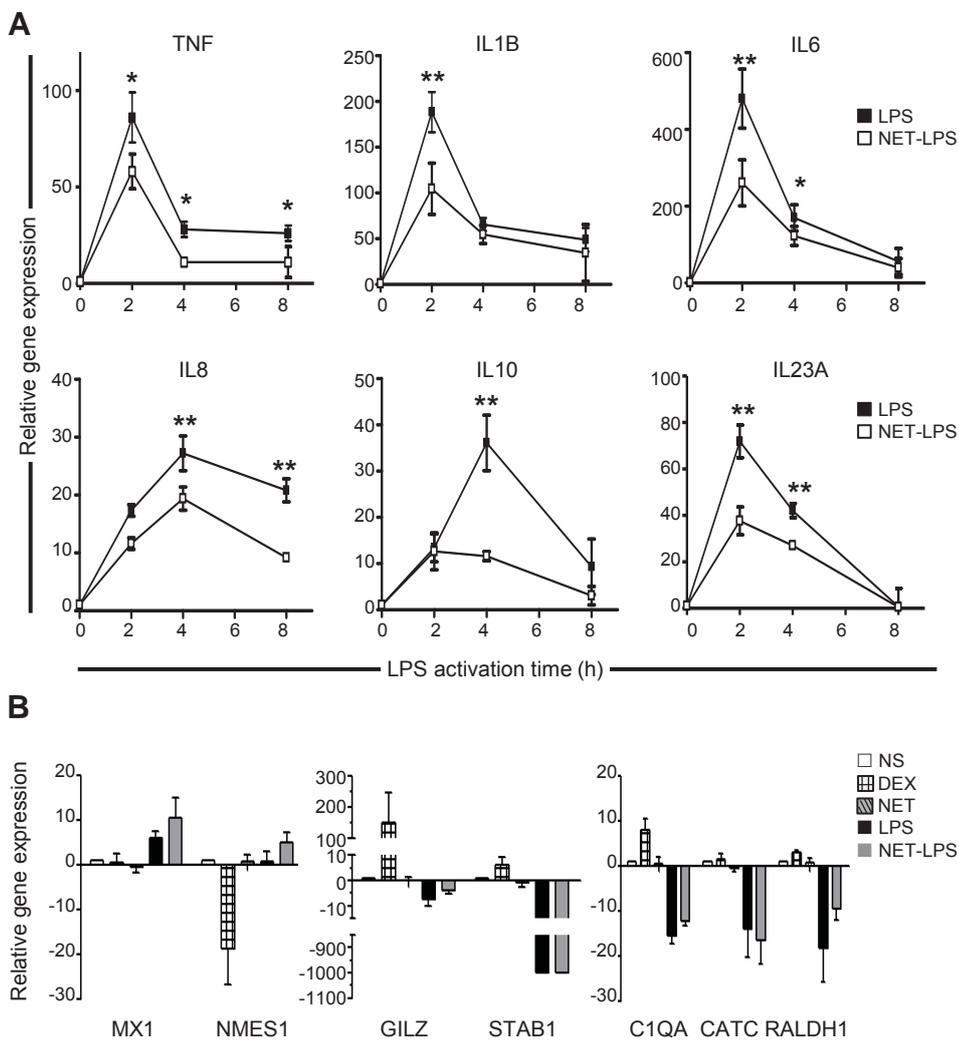
54. Aoki, M., V. Marin-Esteban, R. Weigl, D. Charron, H. Greinix, H. Moins-Teisserenc, and N. Mooney. 2011. Decreased pro-inflammatory cytokines and increased CCR7 expression on T-lymphocyte subsets are predictive of response to extracorporeal photopheresis in patients with GvHD. *British journal of haematology* 154:409-413.
55. Oh, H. M., S. W. Lee, M. H. Park, M. H. Kim, Y. B. Ryu, M. S. Kim, H. H. Kim, K. H. Park, W. S. Lee, S. J. Park, and M. C. Rho. 2012. Norkurarinol inhibits toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated pro-inflammatory signaling pathway and rotavirus replication. *Journal of pharmacological sciences* 118:161-170.
56. von Kockritz-Blickwede, M., O. A. Chow, and V. Nizet. 2009. Fetal calf serum contains heat-stable nucleases that degrade neutrophil extracellular traps. *Blood* 114:5245-5246.
57. Hoffmann, A., A. Levchenko, M. L. Scott, and D. Baltimore. 2002. The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science (New York, N.Y)* 298:1241-1245.
58. Soehnlein, O., and L. Lindbom. 2010. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature reviews* 10:427-439.
59. Haversen, L., B. G. Ohlsson, M. Hahn-Zoric, L. A. Hanson, and I. Mattsby-Baltzer. 2002. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cellular immunology* 220:83-95.
60. Ando, K., K. Hasegawa, K. Shindo, T. Furusawa, T. Fujino, K. Kikugawa, H. Nakano, O. Takeuchi, S. Akira, T. Akiyama, J. Gohda, J. Inoue, and M. Hayakawa. 2010. Human lactoferrin activates NF-kappaB through the Toll-like receptor 4 pathway while it interferes with the lipopolysaccharide-stimulated TLR4 signaling. *The FEBS journal* 277:2051-2066.
61. Kandler, K., R. Shaykhiev, P. Kleemann, F. Kleszcz, M. Lohoff, C. Vogelmeier, and R. Bals. 2006. The anti-microbial peptide LL-37 inhibits the activation of dendritic cells by TLR ligands. *International immunology* 18:1729-1736.
62. Zhang, X., L. Majlessi, E. Deriaud, C. Leclerc, and R. Lo-Man. 2009. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity* 31:761-771.
63. Odobasic, D., A. R. Kitching, Y. Yang, K. M. O'Sullivan, R. C. Muljadi, K. L. Edgton, D. S. Tan, S. A. Summers, E. F. Morand, and S. R. Holdsworth. 2013. Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function. *Blood* 121:4195-4204.
64. Eken, C., O. Gasser, G. Zenhausern, I. Oehri, C. Hess, and J. A. Schifferli. 2008. Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 180:817-824.
65. Munder, M., H. Schneider, C. Luckner, T. Giese, C. D. Langhans, J. M. Fuentes, P. Kropf, I. Mueller, A. Kolb, M. Modolell, and A. D. Ho. 2006. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood* 108:1627-1634.
66. Le-Barillec, K., D. Pidard, V. Balloy, and M. Chignard. 2000. Human neutrophil cathepsin G down-regulates LPS-mediated monocyte activation through CD14 proteolysis. *Journal of leukocyte biology* 68:209-215.
67. O'Donoghue, A. J., Y. Jin, G. M. Knudsen, N. C. Perera, D. E. Jenne, J. E. Murphy, C. S. Craik, and T. W. Hermiston. 2013. Global substrate profiling of proteases in human neutrophil extracellular traps reveals consensus motif predominantly contributed by elastase. *PloS one* 8:e75141.
68. Yang, D., Q. Chen, H. Yang, K. J. Tracey, M. Bustin, and J. J. Oppenheim. 2007. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *Journal of leukocyte biology* 81:59-66.

69. Kazama, H., J. E. Ricci, J. M. Herndon, G. Hoppe, D. R. Green, and T. A. Ferguson. 2008. Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity* 29:21-32.
70. Zimmer, A., S. Luce, F. Gaignier, E. Nony, M. Naveau, A. Biola-Vidamment, M. Pallardy, L. Van Overtvelt, L. Mascarell, and P. Moingeon. 2011. Identification of a new phenotype of tolerogenic human dendritic cells induced by fungal proteases from *Aspergillus oryzae*. *J Immunol* 186:3966-3976.
71. Tillack, K., P. Breiden, R. Martin, and M. Sospedra. 2012. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J Immunol* 188:3150-3159.
72. Doz, E., R. Lombard, F. Carreras, D. Buzoni-Gatel, and N. Winter. 2013. Mycobacteria-Infected Dendritic Cells Attract Neutrophils That Produce IL-10 and Specifically Shut Down Th17 CD4 T Cells through Their IL-10 Receptor. *J Immunol* 191:3818-3826.
73. Pulendran, B., H. Tang, and S. Manicassamy. 2010. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nature immunology* 11:647-655.
74. Barquero-Calvo, E., A. Martirosyan, D. Ordonez-Rueda, V. Arce-Gorvel, A. Alfaro-Alarcon, H. Lepidi, B. Malissen, M. Malissen, J. P. Gorvel, and E. Moreno. 2013. Neutrophils exert a suppressive effect on Th1 responses to intracellular pathogen *Brucella abortus*. *PLoS pathogens* 9:e1003167.
75. Pulendran, B., and D. Artis. 2012. New paradigms in type 2 immunity. *Science (New York, N.Y)* 337:431-435.
76. Marichal, T., K. Ohata, D. Bedoret, C. Mesnil, C. Sabatel, K. Kobiyama, P. Lekeux, C. Coban, S. Akira, K. J. Ishii, F. Bureau, and C. J. Desmet. 2011. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nature medicine* 17:996-1002.
77. Yang, D., Y. V. Postnikov, Y. Li, P. Tewary, G. de la Rosa, F. Wei, D. Klinman, T. Gioannini, J. P. Weiss, T. Furusawa, M. Bustin, and J. J. Oppenheim. 2012. High-mobility group nucleosome-binding protein 1 acts as an alarmin and is critical for lipopolysaccharide-induced immune responses. *The Journal of experimental medicine* 209:157-171.

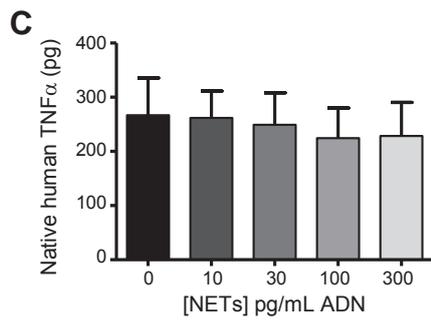
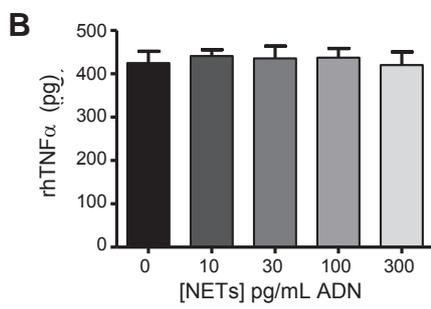
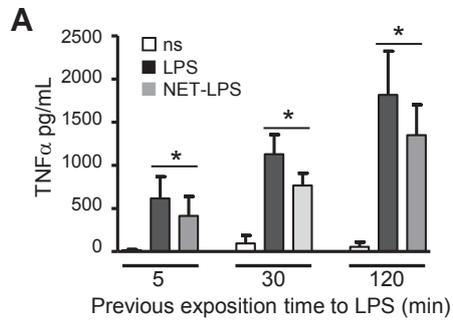
**Figure 1.**



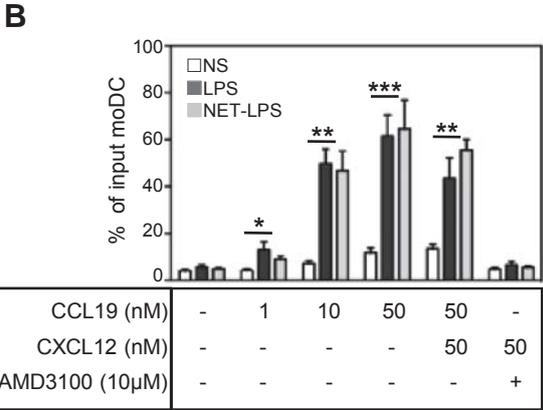
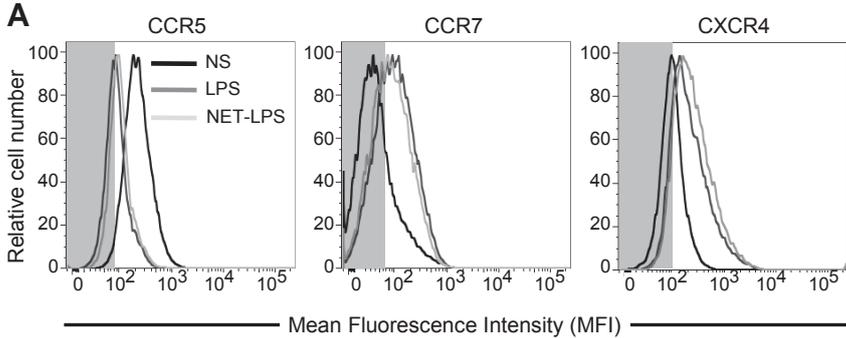
**Figure 2.**



**Figure 3.**



**Figure 4.**



**Figure 5.**

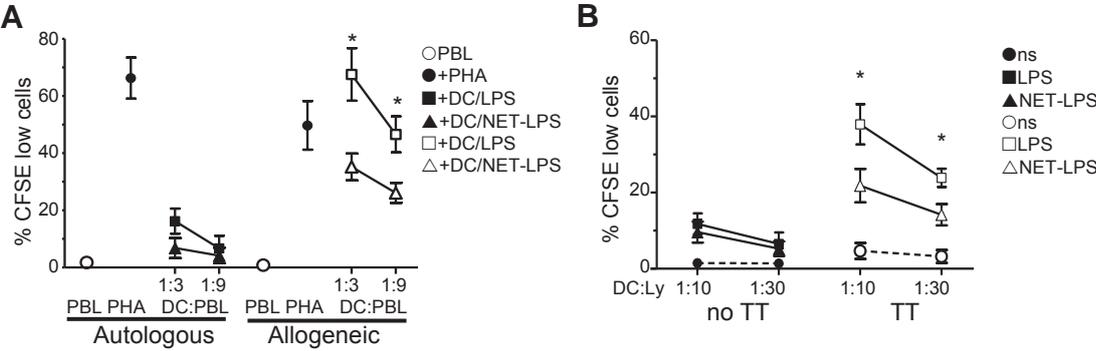
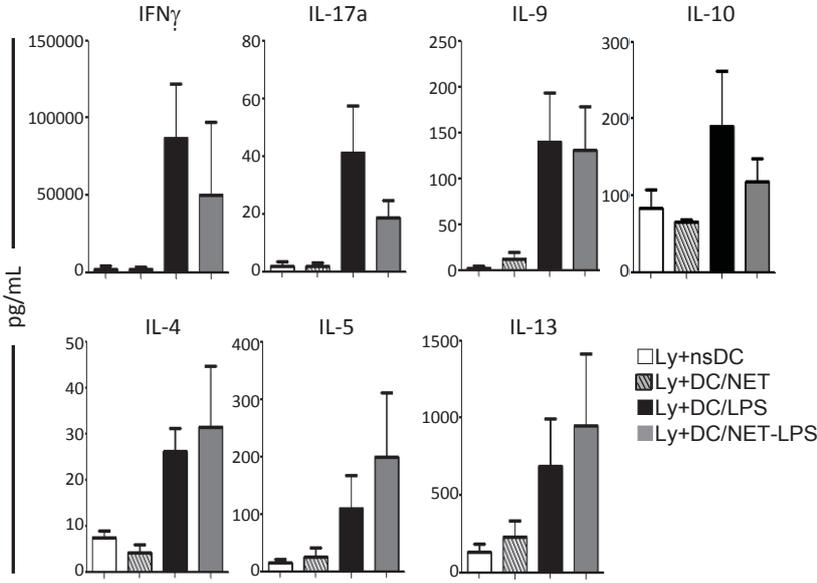


Figure 6.





*Discussion*



La communication entre les différents types cellulaires du système immunitaire est nécessaire pour une réponse immunitaire optimale, en particulier pour les cellules de l'immunité innée qui interviennent en première ligne et permettent une réponse spécifique adaptée dans un second temps. Au cours de ce travail, deux acteurs cellulaires clés ont été choisis, les PN et les DC. En particulier, le rôle régulateur des PN sur les fonctions des DC a été approfondi, concept original qui semble fondamental dans la régulation de la réponse adaptative. Plusieurs travaux ont en effet montré que les PN peuvent non seulement attirer les DC vers le site inflammatoire où ils se trouvent, mais aussi réguler certaines de leurs fonctions grâce à un contact direct et à la libération de médiateurs solubles ou encore de microparticules. Au sein des nombreux marqueurs d'activation des PN, nous avons choisi d'explorer le rôle des NETs, qui sont parmi les marqueurs les plus récemment décrits, et dont les rôles ne sont pas encore totalement connus.

Pour étudier les effets des NETs sur les DC, nous avons tout d'abord développé une technique standardisée permettant d'obtenir des suspensions riches en NETs, constituant un **outil biologique reproductible**, nécessaire à l'étude de ces effets.

Dans la littérature, divers protocoles ont été proposés pour préparer des NETs en suspension et tester leurs effets sur différents types cellulaires. Notre objectif a été d'en faire une analyse critique puis de mettre au point une méthode améliorée. Dans la littérature, la caractérisation est souvent limitée à deux ou trois paramètres (ADN, ELA ou MPO); nous avons donc analysé d'autres marqueurs spécifiques comme l'H3 citrullinée. Même s'il semble impossible de purifier totalement les NETs, il nous a semblé nécessaire de les isoler du mieux possible au sein du surnageant des PN. Par exemple, Lande et *al.*, dans leur travail sur l'implication des NETs dans le lupus, utilisent comme milieu riche en NETs des surnageants de PN activés qui contiennent donc aussi de nombreux médiateurs solubles comme des cytokines ou des enzymes dégranulées (Garcia-Romo et al., 2011; Lande et al., 2011; Villanueva et al., 2011). Dans la littérature, d'autres procédés de production de NETs utilisent des **nucléases comme la DNase et/ou la MNase** (Liu et al., 2012a; Saffarzadeh et al., 2012). Ces nucléases permettent de détacher les NETs du corps cellulaires. Cependant, elles détruisent l'ossature de l'ADN et donc, de ce fait, la structure originale ADN/protéine des NETs. De plus, ces deux nucléases ne permettent de récupérer que des petits fragments d'ADN et des nucléosomes.

De ce fait, dans notre projet, nous nous sommes inspirés du protocole proposé par Urban et *al.* conçu initialement pour isoler les protéines des NETs (Urban et al., 2009) et nous l'avons adapté. Tout d'abord, nous avons changé de *stimulus*. En effet, si le PMA est l'inducteur de la NETose le plus utilisé dans la littérature, nous lui avons préféré l'**ionophore de calcium A23187** qui est facilement éliminable des NETs par lavages, contrairement au PMA (Betz and Henson, 1980). Nous avons démontré que l'A23187 induit des NETs possédant des caractéristiques de structure très similaires à ceux induits par le PMA (ADN, H3, H3cit, ELA et LF). Par contre, la production des NETs est beaucoup plus rapide avec l'A23187 : au bout de 15 à 30 minutes l'ADN extracellulaire est déjà détectable. De plus, l'observation microscopique permet de distinguer les NETs induits par le PMA (forme de nuage), et ceux induits par l'ionophore de calcium (filaments fins et longs). Pour détacher les filaments de NETs du corps cellulaire des PN et les récupérer en suspension, nous avons choisi d'utiliser l'**enzyme de restriction Alu I**. En effet, par comparaison avec la DNase et la MNase, nous avons observé que les NETs obtenus après traitement avec l'Alu I étaient de taille hétérogène mais majoritairement supérieure à 500pb, pouvant aller jusqu'à 12Kpb ou plus. Nous suggérons que ces **NETs de grande taille** sont physiologiquement proches de ce qui peut être observé *in vivo*. Nous avons réalisé ensuite une caractérisation assez complète de ces filaments de NETs, par la mise en évidence ou la quantification non seulement de l'**ADN** et de certaines protéines issues des granulations ou du noyau (**LF, ELA, H3**), mais aussi d'une protéine spécifique des NETs, l'**H3cit**, signature du processus de NETose par l'activation de la PAD4. Afin de déterminer l'activité biologique de ces préparations de NETs, une méthode de quantification de l'activité ELA a été mise au point et a permis de confirmer le maintien de l'activité élastolytique des NETs. D'après la littérature, la liaison de l'ELA à l'ADN inhiberait son activité enzymatique qui serait restaurée suite à l'action de la DNase qui libère l'ELA (Balloy et al., 2003; Dubois et al., 2012) ; nous pouvons faire l'hypothèse que la digestion avec l'Alu I aurait un effet similaire. En effet, les NETs isolés par cette enzyme portent de l'ELA active et son niveau d'activité n'est pas augmenté en présence de la DNase (observations non publiées).

Après avoir mis au point les différentes techniques de production et caractérisation des NETs, nous nous sommes attachés à analyser les résultats de manière quantitative en comparant les échantillons issus de 10 donneurs sains différents. Il a ainsi été

observé une **variabilité quantitative interindividuelle** assez importante dans la composition des NETs. La réalisation d'un test de reproductibilité de notre méthode a permis de confirmer ces données ; en effet, trois préparations indépendantes de NETs issues du même donneur avaient une composition similaire. Cela suggère donc que la capacité de NETose est variable quantitativement selon les individus. Nous pouvons aussi noter que le nombre de PN capables de donner naissance à des NETs est variable selon les individus, comme cela est bien observé en microscopie. Cette variabilité dans la capacité d'induction de NETose n'a pas été encore explicitée. Elle a été évoquée par Urban et *al.* dans son étude protéomique de la composition des NETs (Urban et al., 2009) et par la même équipe dans un article plus récent (Brinkmann et al., 2012). Dans ce dernier travail, ces auteurs proposent une méthode semi-automatique pour quantifier la libération des NETs et pour calculer le pourcentage de PN en NETose. Nos travaux confirment donc cette notion de nécessité de standardiser la quantification des NETs. Ceci est nécessaire pour pouvoir ensuite interpréter leurs concentrations dans les milieux biologiques, ou bien évaluer leurs effets sur des cellules *in vitro*, ce que nous avons fait dans la seconde partie de notre travail de thèse.

Quant à l'**activité biologique de ces NETs isolés**, nous avons utilisé et complété le test de bactéricide utilisé dans un article publié précédemment par notre équipe (Marin-Esteban et al., 2012). Nous avons testé plusieurs souches bactériennes (*Echerichia coli* C1845, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344, *Shigella flexneri* M90T, et *Staphylococcus aureus*). L'**activité bactéricide** des NETs isolés a été partiellement inhibée par un traitement avec de la DNase. Ceci suggère que les médiateurs protéiques des NETs sont des effecteurs microbicides et que leur structuration en filaments améliore cette capacité. Alors que la capacité des NETs à piéger les microorganismes est reconnue par tous les auteurs, il existe des discussions concernant l'induction de la mort de ces microorganismes (Menegazzi et al., 2012; Nauseef, 2012). En utilisant un test de bactéricide en plaque, il a été montré que les NETs piègent les bactéries mais qu'un traitement par des nucléases destructrices des NETs ne diminue pas la capacité bactéricide des PN (Menegazzi et al., 2012). Dans un autre travail, la capacité microbicide des NETs vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* était mesurable seulement après addition d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suggérant le besoin exclusif de l'activité MPO dans cet effet (Parker et al., 2012a). Cependant, depuis leur découverte les publications démontrant la capacité microbicide des NETs sont nombreuses (tableau 4),

et les stratégies développées par les microorganismes pour échapper à cet effet sont de mieux en mieux documentées. Ceci incite à penser que les NETs jouent un rôle important dans le contrôle des infections (Arazna et al., 2013).

En résumé, dans cette première partie, nous avons développé un protocole standardisé qui permet d'isoler et de quantifier des NETs biologiquement actifs à partir de PN humains. Cet outil biologique a permis la réalisation de la seconde partie du travail de thèse qui était l'évaluation du rôle des NETs sur les DC.

**Le rôle des NETs dans la régulation de la réponse immunitaire**, autre que leur activité microbicide, est plutôt décrit par leurs effets délétères sur les tissus environnants au cours des processus inflammatoires. Des études *in vitro*, réalisées par notre équipe, montrent la participation des NETs dans la perte de l'intégrité de l'épithélium intestinal *via* leurs protéases (Marin-Esteban et al., 2012); de même, Saffarzadeh et *al.* ont décrit des effets cytotoxiques des NETs sur les cellules épithéliales et endothéliales pulmonaires *via* les histones (Saffarzadeh et al., 2012). En effet, le rôle pathogène des NETs a été évoqué dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë de l'adulte (Cheng and Palaniyar, 2013), la pré-éclampsie (Gupta et al., 2007), les maladies thrombotiques (Kambas et al., 2012b) ou les maladies auto-immunes (Darrah and Andrade, 2012). La production des NETs ne semble pas être un processus silencieux vis-à-vis des cellules du système immunitaire. Nous avons choisi d'évaluer leur effet sur les DC, cellules clés de la réponse immunitaire.

Pour ce modèle, nous avons travaillé avec des **DC dérivées de monocytes sanguins humains (moDC)**, selon un protocole mis au point dans le laboratoire (Antonios et al., 2010). Ces DC sont un modèle *in vitro* des DC myéloïdes et des DC inflammatoires (Hespel and Moser, 2012).

Nos premiers résultats montrent que **les NETs seuls n'induisent pas d'activation des DC**, attestée par l'expression de molécules de surface caractéristiques de la maturation (HLA-DR, CD40, CD86 et CD80) et la production de cytokines. Nos résultats sont en accord avec ceux d'une étude très récente qui montre que la phagocytose de fragments de NETs par des macrophages dérivés de monocytes n'induit pas leur activation, mais constituerait plutôt un simple mécanisme de clairance (Farrera and Fadeel, 2013). Dans la littérature, il a été montré que certains composants issus des PN comme l'ELA (Tateosian et al., 2011) ou les ectosomes (Eken et al.,

2008), n'induisent pas l'activation des DC mais plutôt la production de TGF $\beta$  et le développement d'un phénotype tolérogène. Nous avons donc suivi par qPCR la transcription de gènes identifiés comme marqueurs d'un profil régulateur : *GILZ*, *STAB1*, *C1qA*, *CATC* et *RALDH1* (Zimmer et al., 2012; Zimmer et al., 2011) et avons montré que les NETs seuls n'activent pas l'expression de ces gènes.

Cependant, quand **les DC sont co-cultivées avec des NETs et un agoniste pro-inflammatoire comme le LPS, nous observons une modulation négative** de leur activation. En effet, les DC activées par le LPS en présence de NETs ont une diminution significative de **l'expression des molécules de surface** citées ci-dessus et de la **production de cytokines** impliquées dans la maturation : TNF $\alpha$ , IL-12, IL-23, IL-6, IL-8 et IL-10. Cette régulation négative a été confirmée par l'utilisation d'autres *stimuli* des DC, tels que le R848 (agoniste TLR7/8) et le PMA (activateur de la voie PKC), en ce qui concerne la production du TNF $\alpha$ , pris comme indicateur de l'activation des DC.

Pour un certain nombre de manipulations portant sur le mécanisme d'action des NETs, nous avons en effet choisi la production de **TNF $\alpha$**  comme marqueur d'activation de la DC, car cette cytokine est un médiateur-clé dans les processus inflammatoires aigus et chroniques. En effet, le TNF $\alpha$  induit non seulement sa propre sécrétion, mais il stimule aussi la production d'autres cytokines et chimiokines inflammatoires participant ainsi à l'entretien et l'amplification de la réponse inflammatoire (Waters et al., 2013). Une altération dans sa production par les DC a un impact direct sur la réponse immunitaire, par exemple dans le développement de la réponse anti-infectieuse (Liu et al., 2012b).

Avant d'appréhender l'étude des mécanismes de cette régulation négative, nous avons voulu vérifier que **ces effets n'étaient pas liés à l'inhibition de la liaison du LPS à son récepteur, ou bien à la dégradation des cytokines produites par les protéases des NETs**. En effet, ces protéases participent à l'effet microbicide puissant des NETs, et pourraient aussi peut-être dégrader les cytokines produites. De plus, il a été décrit que l'ELA était capable de dégrader le CD14 des monocytes et modifier ainsi la fixation du LPS puis l'induction de la production de TNF $\alpha$  (Le-Barillec et al., 1999). Nos résultats nous ont permis de vérifier qu'en présence de NETs, la fixation du LPS à son récepteur sur les DC n'était pas modifiée et que cet effet régulateur des NETs était

visible même si l'engagement du récepteur précédait le contact avec les NETs. De plus, la co-incubation de TNF $\alpha$  recombinant ou présent dans des surnageants de culture de DC avec des NETs ne modifiait pas la concentration du TNF $\alpha$  dans ces différents échantillons. Ceci suggère que la diminution de la concentration en cytokines dans les surnageants de co-culture n'est pas due à leur dégradation par les protéases des NETs. Enfin, nous avons vérifié que le TNF $\alpha$  produit n'était pas séquestré dans le cytoplasme des DC ou maintenu dans sa forme membranaire.

Afin de mieux comprendre la modulation des cytokines par les NETs, **l'étude de la transcription des gènes** codant pour plusieurs cytokines a été réalisée par qPCR (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 et IL-23). Pour toutes ces cytokines, la quantité relative de transcrits induits par le LPS est toujours plus faible lorsque les DC sont co-incubées en présence de NETs, et ce dès le début de l'activation. Ceci suggère que les NETs peuvent moduler l'activation des voies de signalisation qui régulent la transcription de ces gènes, ou bien, postérieurement agissent sur les mécanismes qui stabilisent les ARNm codant pour ces protéines de la réponse inflammatoire.

La cascade de signalisation activée après l'interaction du LPS avec son récepteur (TLR4) comprend **l'activation de la voie des MAPK et de NF $\kappa$ B** aboutissant à la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF particulièrement étudiée dans notre travail. Nous avons débuté l'étude de l'implication de NF $\kappa$ B. Des résultats préliminaires de la translocation nucléaire de la sous-unité p65 dans les DC activées par le LPS seul ou en présence de NETs suggèrent que cette voie serait altérée par la présence de NETs.

La maturation des DC par des *stimuli* inflammatoires ou des produits microbiens leur permet de migrer vers les ganglions ou la rate, où elles vont présenter l'Ag au LyT ; ces signaux leur permettent d'acquérir des caractéristiques de CPA et ainsi de pouvoir moduler l'activation et le phénotype des LyT (Joffre et al., 2009). L'étape suivante de ce travail a donc été de voir si les modifications induites par les NETs sur la maturation des DC étaient associées à des modifications fonctionnelles. Trois fonctions principales ont été étudiées : la capacité de migration, la prolifération des LyT et leur polarisation.

Pour **l'étude de la migration**, deux approches complémentaires ont été réalisées, l'expression de récepteurs de chimiokines par cytométrie en flux et un test de migration cellulaire par transwell. Comme attendu, après stimulation des DC par le LPS, nous

observons une diminution de l'expression de CCR5, une légère augmentation de celle de CXCR4 et une induction importante de CCR7 ; en présence de NETs, ces régulations ne sont pas modifiées (Sallusto et al., 1998) En ce qui concerne le test fonctionnel de migration, les DC stimulées par le LPS ont une forte capacité migratoire vers CXCL12 (ligand de CXCR4) et CCL19 (ligand de CCR7) ; cette capacité migratoire n'est pas affectée par la présence de NETs. Ces résultats suggèrent que les NETs ne modifieraient pas la migration des DC vers les organes lymphoïdes secondaires.

En parallèle, les effets des NETs sur la capacité des DC à activer les LyT ont aussi été recherchés. Dans un premier temps, deux modèles de prolifération ont été utilisés, la **réponse proliférative T allogénique** et la **réponse proliférative T spécifique d'un Ag (la toxine tétanique)**. Dans les deux cas, les DC maturées par le LPS en présence de NETs ont une plus faible capacité à induire la prolifération des LyT CD4<sup>+</sup>. L'activation des LyT par les DC et leur prolifération requièrent deux signaux, l'interaction CMH/Ag/TCR puis le signal de co-stimulation ; dans notre cas, les DC maturées par le LPS en présence de NETs présentent une diminution de l'expression de ces molécules de surface qui pourrait expliquer cette diminution de la prolifération T. Nous pouvons suggérer que la présence de NETs au cours de la maturation des DC affecte la présentation antigénique donc l'interaction DC-LyT. Il serait important aussi d'évaluer l'impact de la régulation négative des DC par les NETs dans d'autres populations lymphocytaires, comme les LyT CD8<sup>+</sup>. par ailleurs, les NETs étant capables d'amorcer les LyT en diminuant leur seuil d'activation (Tillack et al., 2012), il serait intéressant d'évaluer l'effet d'amorçage des NETs dans notre modèle de co-culture et de prolifération.

Dans un second temps, le profil de **polarisation des LyT CD4<sup>+</sup> naïfs** co-cultivés avec des DC/LPS traitées ou non avec des NETs a été analysé. En accord avec la littérature, les DC matures traitées avec le LPS favorisent une polarisation de type Th1 (Mazzoni and Segal, 2004). Si la maturation des DC a eu lieu en présence de NETs, ce profil de polarisation est de type Th2 aux dépens des profils Th1 et Th17 ; ceci est suggéré par la mise en évidence d'une augmentation de l'IL-13, l'IL-5 et l'IL-4 et la diminution de l'INF $\gamma$  et de l'IL-17 respectivement. pour continuer ce travail, il faudra analyser la relevance de ce changement de phénotype de la réponse adaptative. Il sera intéressant aussi d'évaluer si dans un contexte où les DC sont maturées pour induire un phénotype Th2, la présence de NETs favorise cette polarisation. Une autre piste à

suivre est de rechercher si la présence de NETs inhibe la population Th1 ou bien favorise sa conversion en LyT Th2 (Magombedze et al., 2013). La plasticité des LyT CD4<sup>+</sup> a été décrite *in vitro* (Murphy et al., 1996) et *in vivo* (Panzer et al., 2012) ; en effet, le switch entre Th1 et Th2 est possible mais il dépend de l'état de différenciation de la cellule et il est difficile de reprogrammer les sous-populations fonctionnelles.

**Au total, l'ensemble de ces résultats permet de proposer un nouveau rôle pour les NETs dans la réponse immunitaire. Ils seraient capables de moduler négativement la maturation et l'activation des DC et de changer ainsi le profil de polarisation des LyT CD4<sup>+</sup>. Les NETs, produits au cours d'un phénomène inflammatoire, seraient donc également en charge d'induire des signaux anti-inflammatoires, afin de participer à l'arrêt de la réponse immune voire à la réparation tissulaire.**

*Conclusion et  
perspectives*



La description initiale des NETs par A Zychlinsky et *al.* en 2004 a conclu à la découverte d'un nouveau mécanisme microbicide. Mais rapidement, les travaux suivants ont décrit les dommages tissulaires que pouvaient engendrer ces structures, au même titre que des PN entiers activés, lorsqu'elles étaient en contact avec des épithéliums ou des endothéliums, par exemple, au cours de pathologies comme la mucoviscidose, le sepsis, la thrombose ou l'asthme. Ont suivi ensuite des découvertes majeures dans quant capacité d'induire et entretenir des maladies auto-immunes dont les Ag cibles étaient des constituants des NETs (psoriasis, lupus ou vascularites). L'intervention des NETs dans la physiopathologie de maladies inflammatoires aiguës ou chroniques est un sujet qui est actuellement exploré par de nombreux travaux et qui permettra de mieux comprendre le rôle de ce mécanisme cellulaire original. En réponse à tout mécanisme d'activation, il existe des mécanismes de régulation dont nous ne connaissons encore que quelques bribes. On sait par exemple que la **DNase plasmatique peut démanteler** le réseau de **NETs**; plus récemment, leur clairance par les macrophages a été aussi évoquée.

Dans ce travail de thèse, nous avons choisi d'explorer pour la première fois le rôle potentiel des NETs sur les DC, car les PN modulent (activation ou régulation) certaines fonctions des DC *via* par exemple les protéases ou les ectosomes. A l'issue de ce travail, nous pouvons proposer que **la libération de NETs par les PN activés constitue un signal anti-inflammatoire qui participerait à la régulation physiologique du système immunitaire**. Cet effet régulateur interviendrait sans doute en deuxième ligne lorsque l'effet pro-inflammatoire, microbicide par exemple, ne serait plus nécessaire. Ces hypothèses restent à démontrer. Nos travaux suggèrent que les NETs ont la capacité de diminuer la maturation des moDC induite par des agonistes de TLR (TLR4, TLR7/TLR8) et par le PMA ; ceci est attesté par une modification du phénotype membranaire et de la production de cytokines. Les conséquences fonctionnelles sont en particulier une diminution de la capacité de migration des DC, de la prolifération des LyT CD4<sup>+</sup> et l'induction d'une polarisation plutôt Th2.

Les premières expériences que nous avons menées avec **les NETs** purifiés ont démontré que **seuls, ils n'avaient pas la capacité de moduler le phénotype et les fonctions des DC immatures**. Les NETs, dans notre modèle ne peuvent agir qu'au cours de la maturation des DC, nécessitant sans doute des coopérations avec les signaux de maturation intra ou extracellulaires. Ces mécanismes ne sont pas connus et

pourraient constituer une perspective intéressante de nos travaux. De plus, dans la littérature, les NETs issus de PN de patients sont capables de moduler directement des fonctions cellulaires. Par exemple, les PN de patients lupiques produisent des NETs qui peuvent induire la production d'INF $\alpha$  par les pDC (Garcia-Romo et al., 2011; Lande et al., 2011; Villanueva et al., 2011) ; au cours des vascularites à ANCA, ce même type d'effet activateur cellulaire est retrouvé (Nakazawa et al., 2012). Il serait donc intéressant de **produire et isoler**, grâce à notre méthode originale, des **NETs provenant de différents contextes inflammatoires** chez l'homme et tester leur effet sur les DC (effet direct ou effet sur la maturation).

Dans ce travail, nous avons aussi montré que **la régulation négative des NETs sur la maturation induite par le LPS était visible très tôt sur la transcription des gènes codant pour des cytokines**. Ces résultats nous conduisent à évaluer l'implication des **NETs dans la stabilité de l'ARNm**. La régulation post-transcriptionnelle de nombreuses protéines inflammatoires, parmi lesquelles le TNF $\alpha$ , se fait au niveau de la traduction et/ou de la stabilité des ARNm, et est à l'origine du niveau d'expression des protéines. Dans la plupart des cas, la régulation post-transcriptionnelle est médiée par des éléments cis localisés dans la région non traduite 3' (3'UTR) des ARNm (Stoecklin and Anderson, 2006). Ces éléments sont capables de recruter des protéines spécifiques qui, à leur tour, régulent la traduction et/ou la stabilité de l'ARNm. La présence d'adenine/uridine-rich element (ARE) au niveau de la région 3'UTR des ARNm de nombreuses protéines pro-inflammatoires est à l'origine de leur dégradation rapide (Stoecklin and Anderson, 2006). Nous testons actuellement l'hypothèse que **les NETs peuvent affecter la demi-vie des ARNm du TNF $\alpha$** , de manière directe ou indirecte.

Nous avons commencé à explorer les effets des NETs sur les voies de signalisation activées par le LPS dans les DC. **Nos résultats préliminaires suggèrent que l'effet modulateur des NETs pourrait impliquer une altération de la translocation nucléaire de NF $\kappa$ B**. Ces résultats, s'ils sont confirmés, seront suivis de l'étude des mécanismes qui régulent cette voie NF $\kappa$ B. Certains auteurs ont suggéré une régulation autocrine de cette voie par **l'augmentation de l'expression de la sous-unité p50**, responsable de l'inhibition de la transcription des cytokines en particulier du TNF $\alpha$  dans les macrophages (Baer et al., 1998). Plus récemment, **le complexe formé par p50 et RelB** (la voie alternative/non-canonique ) a été évoqué comme responsable

de la modulation négative de la signalisation du complexe p50-p65 (la voie classique/canonique) et, par conséquent, de l'inhibition de la synthèse de TNF $\alpha$  par les macrophages et les DC (Gasparini et al., 2013). Nous faisons l'hypothèse que les NETs pourraient agir à ce niveau, soit par l'induction de la transcription de p50, soit en favorisant la formation du complexe p50-RelB.

Une autre piste d'exploration des voies de signalisation modulées par les NETs est l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), impliquée dans l'activation cellulaire qui fait suite à l'engagement de plusieurs TLR (Troutman et al., 2012a). PI3K est exprimée de manière constitutive dans les cellules de l'immunité innée. Elle est rapidement activée en réponse à un agent infectieux, agissant comme un régulateur négatif précoce de la réponse inflammatoire (Fukao and Koyasu, 2003). En effet, la voie de la PI3K module les cascades des MAPK et l'activation de NF $\kappa$ B dans les monocytes en réponse au LPS, entraînant une diminution de la production de TNF- $\alpha$  (Guha and Mackman, 2002). L'utilisation de souris invalidées pour le gène codant pour la sous-unité p85 de la PI3K a démontré aussi que la PI3K régulait négativement la production d'IL-12 par les DC (Fukao et al., 2002). L'ensemble de ces données nous permet d'émettre l'hypothèse que les NETs pourraient moduler cette voie de signalisation liée à la PI3K, ce qui constitue une autre perspective de ce travail.

Dans ce contexte, une autre molécule pourrait être impliquée et assurer un lien entre les TLR et l'activation de la PI3K : il s'agit de **BCAP** (B-cell adaptor for PI3K) (Troutman et al., 2012a). Le BCAP est essentiel à l'activation PI3K lors de la stimulation cellulaire par des ligands de TLR. Il lie le TLR à la PI3K par un domaine TIR cryptique de son extrémité N-terminale, qui sera ensuite utilisé pour le recrutement des composants en aval de cette voie de signalisation. BCAP peut aussi agir précocement dans la transduction du signal en engageant MyD88 *via* son domaine TIR et potentiellement réduire la disponibilité des MyD88 pour l'activation de NF $\kappa$ B, affectant ainsi la voie majeure de signalisation de la plupart des TLR (Troutman et al., 2012b). Ces auteurs montrent que les DC déficientes en BCAP ont une capacité augmentée à faire proliférer les LyT CD4<sup>+</sup> et à induire un phénotype effecteur Th1/Th17 (Troutman et al., 2012b). Nous pouvons envisager l'hypothèse que les NETs pourraient réguler la disponibilité de cette molécule et ainsi participer à l'effet anti-inflammatoire que nous décrivons.

Nos résultats nous encouragent également à explorer un autre mécanisme, l'induction de l'expression de **microRNA (miRNA)** par les NETs. Ce sont de petites molécules d'ARN non codantes exprimées dans les cellules immunitaires, capables de dégrader ou réprimer la traduction des ARNm cibles, jouant ainsi un rôle important, récemment décrit, dans la modulation de la réponse immunitaire (O'Connell et al., 2012). Il est décrit, par exemple, que l'expression de certains miRNA au cours de l'activation cellulaire *via* les TLR va permettre de réguler la cascade de signalisation. Parmi les miRNA connus pour moduler négativement la signalisation TLR se trouvent miR-146a (Taganov et al., 2006) et miR-21 (Sheedy et al., 2010) qui inhibent l'activation de la voie NFκB. Il a été aussi évoqué l'induction de deux miRNA régulateurs de l'inflammation (le miR146a et le miR-155) par les DC en réponse à *H. pylori* ; en effet, ils seraient capables de réguler la production de cytokines, ciblant particulièrement la production de TNFα (Hoces de la Guardia et al., 2013). De la même manière, miR-125b et let-7 vont aussi réguler la réponse inflammatoire ayant comme cibles les ARNm du TNFα et de l'IL-6 respectivement (Iliopoulos et al., 2009; Tili et al., 2007). En ce qui concerne les DC, certains miRNA ont des rôles importants dans la régulation du développement, de la différenciation et de la maturation. Parmi ces miRNA deux semblent intéressants à explorer en raison de leur implication dans la modulation de la réponse inflammatoire : miR-142-3p et miR-148 (Turner et al., 2011). En résumé, l'implication de miRNA dans les effets modulateurs des NETs que nous avons observés est une question importante que nous projetons d'aborder dans la suite de nos travaux, par une approche multi-array ou par ciblage de certains miRNA.

Une autre question fondamentale reste ouverte à la fin de ce travail de thèse. Il s'agit de l'identité des **composants des NETs à l'origine de ces effets** régulateurs. Plusieurs des protéines présentes à la surface des NETs sont connues pour avoir un effet anti-inflammatoire. Les candidats principaux pourraient être les **protéases**, car elles sont, en particulier, les protéines des granulations les plus abondantes dans les NETs (Urban et al., 2009). De plus, elles ont été impliquées dans l'effet inhibiteur de la production du TNFα et d'autres cytokines pro-inflammatoires, après activation par *C. albicans* et le LPS (Gresnigt et al., 2012). Des résultats préliminaires faisant appel à un inhibiteur de protéases, suggèrent que cette hypothèse pourrait être valide et nous permettent de mettre en place des études, avec des inhibiteurs plus spécifiques de composants des NETs, par une approche de protéines candidates. En particulier, l'ELA

est connue pour la mise en place d'un environnement immuno-régulateur en induisant la production de TGF- $\beta$ 1 par les DC et, de ce fait, l'activation d'une réponse T régulatrice (Maffia et al., 2007; Tateosian et al., 2011). Un second candidat pourrait être une ou plusieurs **alarmines comme la LF et la cathelicidine LL-37**. En effet, ces deux molécules sont connues, d'une part pour induire directement l'activation des DC (Yang et al., 2009), et, d'autre part, pour moduler négativement ces cellules en présence d'agonistes TLR (Ando et al., 2010; Di Nardo et al., 2007; Drago-Serrano et al., 2012). D'autres protéines granulaires moins exprimées sur les NETs mais biologiquement très actives seraient aussi intéressantes à explorer en tant que candidates immunomodulatrices. En effet, la **MPO** a été récemment impliquée dans la diminution de l'inflammation tissulaire par l'inhibition de l'activation des DC (Odobasic et al., 2013). De plus, la BPI présente un effet anti-inflammatoire *in vivo*, chez des patients atteints de brûlures, en induisant une réduction de la transcription du CD14 et du TNF $\alpha$  (Fang et al., 2001).

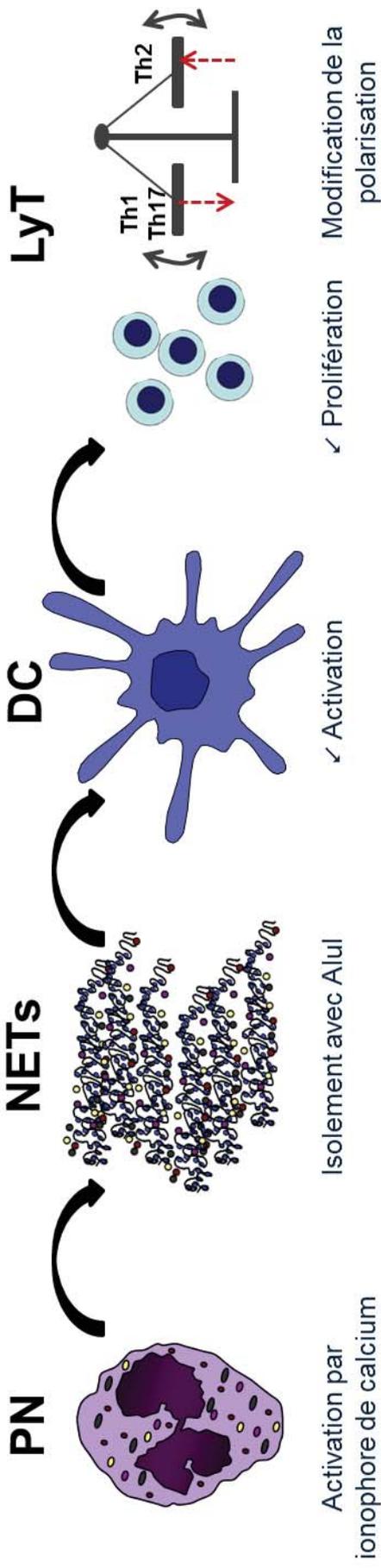
Nous souhaitons également analyser le rôle des **histones** des NETs dans cet effet anti-inflammatoire sur les DC. Ce sont les protéines les plus abondantes des NETs et la présence de H2A, H2B, H3 et H4 ainsi que leurs homologues citrullinée a été décrite. Leur rôle biologique dans la réponse immunitaire a été peu exploré mais semblerait plutôt cytotoxique (Saffarzadeh et al., 2012); au cours de traumatismes sévères comme le sepsis, la concentration d'histones circulants est reliée aux défaillances d'organes, en particulier le poumon (Abrams et al., 2013). En utilisant un modèle murin d'ischémie-reperfusion hépatique, il a été démontré que les histones endogènes se comportaient comme des DAMP qui interagissent avec TLR9 et MyD88 pour initier l'inflammation (Huang et al., 2011).

Enfin, des perspectives d'étude des interactions ***in vivo*** existent par la mise en place de deux modèles animaux de maladies inflammatoires aiguës et chroniques : **l'hypersensibilité de contact** (en collaboration avec le Pr Saadia Kerdine-Römer) et le **choc anaphylactique** (en collaboration avec le Dr Pierre Bruhns) au cours desquels la production de NETs va être analysée ainsi que leur éventuelle co-localisation avec des DC au niveau des tissus (peau, poumon) et les conséquences de ces interactions NETs/DC.

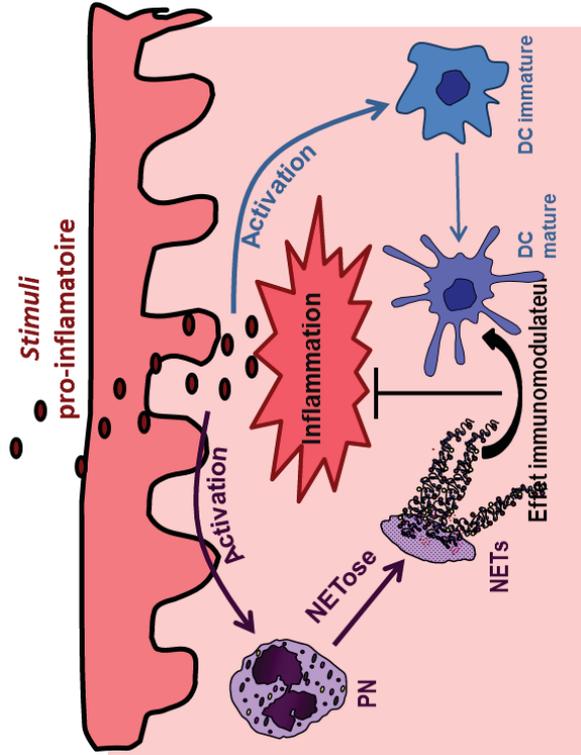
La **figure 44** résume l'ensemble des résultats acquis et les perspectives de ces travaux.



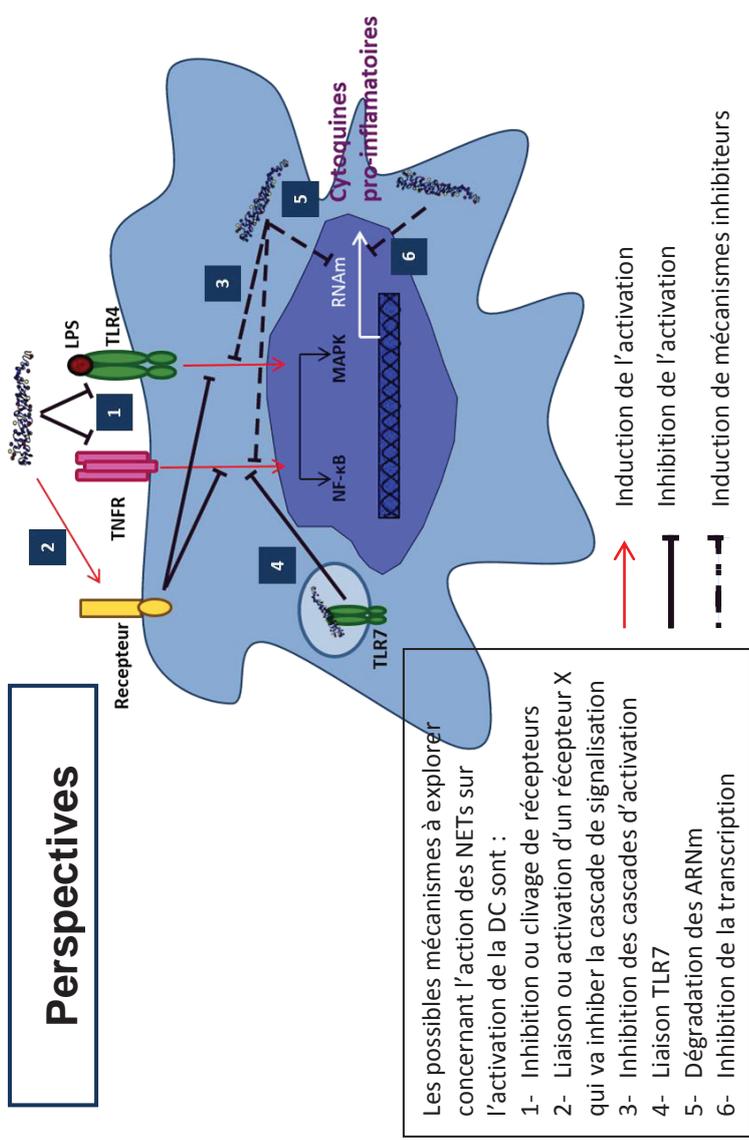
### Effet *in vitro*



### Hypothèse *in vivo*



### Perspectives





# *Bibliographie*



- Abadie, V., E. Badell, P. Douillard, D. Ensergueix, P.J. Leenen, M. Tanguy, L. Fiette, S. Saeland, B. Gicquel, and N. Winter. 2005. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood*. 106:1843-1850.
- Abi Abdallah, D.S., and E.Y. Denkers. 2012. Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. *Front Immunol*. 3:382.
- Abi Abdallah, D.S., C.E. Egan, B.A. Butcher, and E.Y. Denkers. 2011. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol*. 23:317-326.
- Abi Abdallah, D.S., C. Lin, C.J. Ball, M.R. King, G.E. Duhamel, and E.Y. Denkers. 2012. *Toxoplasma gondii* triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infect Immun*. 80:768-777.
- Abrams, S.T., N. Zhang, J. Manson, T. Liu, C. Dart, F. Baluwa, S.S. Wang, K. Brohi, A. Kipar, W. Yu, G. Wang, and C.H. Toh. 2013. Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 187:160-169.
- Afonso, P.V., M. Janka-Junttila, Y.J. Lee, C.P. McCann, C.M. Oliver, K.A. Aamer, W. Losert, M.T. Cicerone, and C.A. Parent. 2012. LTB4 is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis. *Dev Cell*. 22:1079-1091.
- Agache, I., C. Akdis, M. Jutel, and J.C. Virchow. 2012. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy*. 67:835-846.
- Aherne, C.M., C.B. Collins, J.C. Masterson, M. Tizzano, T.A. Boyle, J.A. Westrich, J.A. Parnes, G.T. Furuta, J. Rivera-Nieves, and H.K. Eltzschig. 2012. Neuronal guidance molecule netrin-1 attenuates inflammatory cell trafficking during acute experimental colitis. *Gut*. 61:695-705.
- Akdis, M., O. Palomares, W. van de Veen, M. van Splunter, and C.A. Akdis. 2012. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol*. 129:1438-1449; quiz1450-1431.
- Akong-Moore, K., O.A. Chow, M. von Kockritz-Blickwede, and V. Nizet. 2012. Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation. *PLoS One*. 7:e42984.
- Albanesi, M., D.A. Mancardi, L.E. Macdonald, B. Iannascoli, L. Zitvogel, A.J. Murphy, M. Daeron, J.H. Leusen, and P. Bruhns. 2012. Cutting edge: FcγRIII (CD16) and FcγRI (CD64) are responsible for anti-glycoprotein 75 monoclonal antibody TA99 therapy for experimental metastatic B16 melanoma. *J Immunol*. 189:5513-5517.
- Albert, M.L., B. Sauter, and N. Bhardwaj. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. 392:86-89.
- Alghamdi, A.S., B.J. Lovaas, S.L. Bird, G.C. Lamb, A.K. Rendahl, P.C. Taube, and D.N. Foster. 2009. Species-specific interaction of seminal plasma on sperm-neutrophil binding. *Anim Reprod Sci*. 114:331-344.

- Almyroudis, N.G., M.J. Grimm, B.A. Davidson, M. Rohm, C.F. Urban, and B.H. Segal. 2013. NETosis and NADPH oxidase: at the intersection of host defense, inflammation, and injury. *Front Immunol.* 4:45.
- Alters, S.E., J.R. Gadea, B. Holm, J. Lebkowski, and R. Philip. 1999. IL-13 can substitute for IL-4 in the generation of dendritic cells for the induction of cytotoxic T lymphocytes and gene therapy. *J Immunother.* 22:229-236.
- Altincicek, B., S. Stotzel, M. Wygrecka, K.T. Preissner, and A. Vilcinskas. 2008. Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. *J Immunol.* 181:2705-2712.
- Amigorena, S., and A. Savina. 2010. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 22:109-117.
- Amulic, B., C. Cazalet, G.L. Hayes, K.D. Metzler, and A. Zychlinsky. 2012. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 30:459-489.
- Ancelin, M., S. Chollet-Martin, M.A. Herve, C. Legrand, J. El Benna, and M. Perrot-Appinat. 2004. Vascular endothelial growth factor VEGF189 induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism. *Lab Invest.* 84:502-512.
- Ando, K., K. Hasegawa, K. Shindo, T. Furusawa, T. Fujino, K. Kikugawa, H. Nakano, O. Takeuchi, S. Akira, T. Akiyama, J. Gohda, J. Inoue, and M. Hayakawa. 2010. Human lactoferrin activates NF-kappaB through the Toll-like receptor 4 pathway while it interferes with the lipopolysaccharide-stimulated TLR4 signaling. *FEBS J.* 277:2051-2066.
- Angel, C.E., E. George, A.E. Brooks, L.L. Ostrovsky, T.L. Brown, and P.R. Dunbar. 2006. Cutting edge: CD1a+ antigen-presenting cells in human dermis respond rapidly to CCR7 ligands. *J Immunol.* 176:5730-5734.
- Antonios, D., P. Rousseau, A. Larange, S. Kerdine-Romer, and M. Pallardy. 2010. Mechanisms of IL-12 synthesis by human dendritic cells treated with the chemical sensitizer NiSO<sub>4</sub>. *J Immunol.* 185:89-98.
- Appelmelk, B.J., I. van Die, S.J. van Vliet, C.M. Vandenbroucke-Grauls, T.B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2003. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol.* 170:1635-1639.
- Arai, Y., K. Yamashita, K. Mizugishi, T. Watanabe, S. Sakamoto, T. Kitano, T. Kondo, H. Kawabata, N. Kadowaki, and A. Takaori-Kondo. 2013. Serum neutrophil extracellular trap levels predict thrombotic microangiopathy after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.*
- Arazna, M., M.P. Pruchniak, and U. Demkow. 2013. Neutrophil extracellular traps in bacterial infections: strategies for escaping from killing. *Respir Physiol Neurobiol.* 187:74-77.
- Ardi, V.C., T.A. Kupriyanova, E.I. Deryugina, and J.P. Quigley. 2007. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:20262-20267.

- Ariel, A., G. Fredman, Y.P. Sun, A. Kantarci, T.E. Van Dyke, A.D. Luster, and C.N. Serhan. 2006. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat Immunol.* 7:1209-1216.
- Ariel, A., and C.N. Serhan. 2012. New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation. *Front Immunol.* 3:4.
- Aulik, N.A., K.M. Hellenbrand, H. Klos, and C.J. Czuprynski. 2010. Mannheimia haemolytica and its leukotoxin cause neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils. *Infect Immun.* 78:4454-4466.
- Averhoff, P., M. Kolbe, A. Zychlinsky, and Y. Weinrauch. 2008. Single residue determines the specificity of neutrophil elastase for Shigella virulence factors. *J Mol Biol.* 377:1053-1066.
- Azevedo, E.P., A.B. Guimaraes-Costa, G.S. Torezani, C.A. Braga, F.L. Palhano, J.W. Kelly, E.M. Saraiva, and D. Foguel. 2012. Amyloid fibrils trigger the release of neutrophil extracellular traps (NETs), causing fibril fragmentation by NET-associated elastase. *J Biol Chem.* 287:37206-37218.
- Bachawaty, T., S.L. Washington, and S.W. Walsh. 2010. Neutrophil expression of cyclooxygenase 2 in preeclampsia. *Reprod Sci.* 17:465-470.
- Baer, M., A. Dillner, R.C. Schwartz, C. Sedon, S. Nedospasov, and P.F. Johnson. 1998. Tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages is attenuated by an autocrine factor that preferentially induces NF-kappaB p50. *Mol Cell Biol.* 18:5678-5689.
- Baker, V.S., G.E. Imade, N.B. Molta, P. Tawde, S.D. Pam, M.O. Obadofin, S.A. Sagay, D.Z. Egah, D. Iya, B.B. Afolabi, M. Baker, K. Ford, R. Ford, K.H. Roux, and T.C. Keller, 3rd. 2008. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in Plasmodium falciparum infected children under six years of age. *Malar J.* 7:41.
- Balloy, V., J.M. Sallenave, B. Crestani, M. Dehoux, and M. Chignard. 2003. Neutrophil DNA contributes to the antielastase barrier during acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 28:746-753.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 18:767-811.
- Bandholtz, L., G.J. Ekman, M. Vilhelmsson, E. Buentke, B. Agerberth, A. Scheynius, and G.H. Gudmundsson. 2006. Antimicrobial peptide LL-37 internalized by immature human dendritic cells alters their phenotype. *Scand J Immunol.* 63:410-419.
- Barletta, K.E., R.E. Cagnina, M.D. Burdick, J. Linden, and B. Mehrad. 2012. Adenosine A(2B) receptor deficiency promotes host defenses against gram-negative bacterial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 186:1044-1050.
- Bartneck, M., H.A. Keul, G. Zwadlo-Klarwasser, and J. Groll. 2010. Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells. *Nano Lett.* 10:59-63.

- Basran, A., M. Jabeen, L. Bingle, C.A. Stokes, D.H. Dockrell, M.K. Whyte, S.R. Walmsley, K.R. Higgins, S.N. Vogel, H.L. Wilson, L.R. Prince, E.C. Prestwich, R.A. Sabroe, L.C. Parker, and I. Sabroe. 2013. Roles of neutrophils in the regulation of the extent of human inflammation through delivery of IL-1 and clearance of chemokines. *J Leukoc Biol.* 93:7-19.
- Batra, S., S. Cai, G. Balamayooran, and S. Jeyaseelan. 2012. Intrapulmonary administration of leukotriene B(4) augments neutrophil accumulation and responses in the lung to Klebsiella infection in CXCL1 knockout mice. *J Immunol.* 188:3458-3468.
- Bazzoni, F., N. Tamassia, M. Rossato, and M.A. Cassatella. 2010. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. *Eur J Immunol.* 40:2360-2368.
- Beauvillain, C., P. Cunin, A. Doni, M. Scotet, S. Jaillon, M.L. Loiry, G. Magistrelli, K. Masternak, A. Chevailler, Y. Delneste, and P. Jeannin. 2011. CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood.* 117:1196-1204.
- Beauvillain, C., Y. Delneste, M. Scotet, A. Peres, H. Gascan, P. Gueronprez, V. Barnaba, and P. Jeannin. 2007. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood.* 110:2965-2973.
- Bedard, K., and K.H. Krause. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87:245-313.
- Beiter, K., F. Wartha, B. Albiger, S. Normark, A. Zychlinsky, and B. Henriques-Normark. 2006. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 16:401-407.
- Benabid, R., J. Wartelle, L. Malleret, N. Guyot, S. Gangloff, F. Lebargy, and A. Belaouaj. 2012. Neutrophil elastase modulates cytokine expression: contribution to host defense against *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia. *J Biol Chem.* 287:34883-34894.
- Bennouna, S., S.K. Bliss, T.J. Curiel, and E.Y. Denkers. 2003. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol.* 171:6052-6058.
- Bennouna, S., and E.Y. Denkers. 2005. Microbial antigen triggers rapid mobilization of TNF-alpha to the surface of mouse neutrophils transforming them into inducers of high-level dendritic cell TNF-alpha production. *J Immunol.* 174:4845-4851.
- Berends, E.T., A.R. Horswill, N.M. Haste, M. Monestier, V. Nizet, and M. von Kockritz-Blickwede. 2010. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun.* 2:576-586.
- Berger-Achituv, S., V. Brinkmann, U.A. Abed, L.I. Kuhn, J. Ben-Ezra, R. Elhasid, and A. Zychlinsky. 2013. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Front Immunol.* 4:48.
- Betz, S.J., and P.M. Henson. 1980. Production and release of platelet-activating factor (PAF); dissociation from degranulation and superoxide production in the human neutrophil. *J Immunol.* 125:2756-2763.

- Bianchi, M., A. Hakkim, V. Brinkmann, U. Siler, R.A. Seger, A. Zychlinsky, and J. Reichenbach. 2009. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*. 114:2619-2622.
- Bianchi, M., M.J. Niemiec, U. Siler, C.F. Urban, and J. Reichenbach. 2011. Restoration of anti-Aspergillus defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J Allergy Clin Immunol*. 127:1243-1252 e1247.
- Bigley, V., M. Haniffa, S. Doulatov, X.N. Wang, R. Dickinson, N. McGovern, L. Jardine, S. Pagan, I. Dimmick, I. Chua, J. Wallis, J. Lordan, C. Morgan, D.S. Kumararatne, R. Doffinger, M. van der Burg, J. van Dongen, A. Cant, J.E. Dick, S. Hambleton, and M. Collin. 2011. The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J Exp Med*. 208:227-234.
- Bilate, A.M., and J.J. Lafaille. 2012. Induced CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol*. 30:733-758.
- Blom, B., S. Ho, S. Antonenko, and Y.J. Liu. 2000. Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 192:1785-1796.
- Blomgran, R., and J.D. Ernst. 2011. Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol*. 186:7110-7119.
- Bluml, S., C. Scheinecker, J.S. Smolen, and K. Redlich. 2012. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis. *Int Immunol*. 24:275-281.
- Bogoevska, V., A. Horst, B. Klampe, L. Lucka, C. Wagener, and P. Nollau. 2006. CEACAM1, an adhesion molecule of human granulocytes, is fucosylated by fucosyltransferase IX and interacts with DC-SIGN of dendritic cells via Lewis x residues. *Glycobiology*. 16:197-209.
- Borregaard, N. 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 33:657-670.
- Bourke, E., A. Casseti, A. Villa, E. Fadlon, F. Colotta, and A. Mantovani. 2003. IL-1 beta scavenging by the type II IL-1 decoy receptor in human neutrophils. *J Immunol*. 170:5999-6005.
- Boya, P., F. Reggiori, and P. Codogno. 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol*. 15:1017.
- Brandes, R.P., N. Weissmann, and K. Schroder. 2013. Nox Family NADPH Oxidases in Mechano-Transduction: Mechanisms and Consequences. *Antioxid Redox Signal*.
- Branitzki-Heinemann, K., C.Y. Okumura, L. Vollger, Y. Kawakami, T. Kawakami, H.Y. Naim, V. Nizet, and M. Von Kockritz-Blickwede. 2012. A novel role for the transcription factor HIF-1alpha in the formation of mast cell extracellular traps. *Biochem J*. 446:159-163.
- Branzk, N., and V. Papayannopoulos. 2013. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin Immunopathol*. 35:513-530.
- Brill, A., T.A. Fuchs, A.S. Savchenko, G.M. Thomas, K. Martinod, S.F. De Meyer, A.A. Bhandari, and D.D. Wagner. 2012. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*. 10:136-144.

- Brinkmann, V., C. Goosmann, L.I. Kuhn, and A. Zychlinsky. 2012. Automatic quantification of in vitro NET formation. *Front Immunol.* 3:413.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D.S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 303:1532-1535.
- Brinkmann, V., and A. Zychlinsky. 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol.* 5:577-582.
- Brinkmann, V., and A. Zychlinsky. 2012. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol.* 198:773-783.
- Bruhns, P. 2012. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood.* 119:5640-5649.
- Bruns, S., O. Kniemeyer, M. Hasenberg, V. Aimanianda, S. Nietzsche, A. Thywissen, A. Jeron, J.P. Latge, A.A. Brakhage, and M. Gunzer. 2010. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog.* 6:e1000873.
- Buchanan, J.T., A.J. Simpson, R.K. Aziz, G.Y. Liu, S.A. Kristian, M. Kotb, J. Feramisco, and V. Nizet. 2006. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 16:396-400.
- Buckley, C.D., E.A. Ross, H.M. McGettrick, C.E. Osborne, O. Haworth, C. Schmutz, P.C. Stone, M. Salmon, N.M. Matharu, R.K. Vohra, G.B. Nash, and G.E. Rainger. 2006. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J Leukoc Biol.* 79:303-311.
- Busch, R., C.H. Rinderknecht, S. Roh, A.W. Lee, J.J. Harding, T. Burster, T.M. Hornell, and E.D. Mellins. 2005. Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression. *Immunol Rev.* 207:242-260.
- Carmona-Rivera, C., and M.J. Kaplan. 2013. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol.* 35:455-463.
- Carrion Sde, J., S.M. Leal, Jr., M.A. Ghannoum, V. Aimanianda, J.P. Latge, and E. Pearlman. 2013. The RodA Hydrophobin on *Aspergillus fumigatus* Spores Masks Dectin-1- and Dectin-2-Dependent Responses and Enhances Fungal Survival In Vivo. *J Immunol.* 191:2581-2588.
- Carvalho-Tavares, J., M.J. Hickey, J. Hutchison, J. Michaud, I.T. Sutcliffe, and P. Kubes. 2000. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res.* 87:1141-1148.
- Cassatella, M.A. 1999. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol.* 73:369-509.
- Cassatella, M.A. 2013. L33. Neutrophil in immunity: a key modulator. *Presse Med.* 42:594-595.

- Cassatella, M.A., V. Huber, F. Calzetti, D. Margotto, N. Tamassia, G. Peri, A. Mantovani, L. Rivoltini, and C. Tecchio. 2006. Interferon-activated neutrophils store a TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) intracellular pool that is readily mobilizable following exposure to proinflammatory mediators. *J Leukoc Biol.* 79:123-132.
- Cassatella, M.A., M. Locati, and A. Mantovani. 2009. Never underestimate the power of a neutrophil. *Immunity.* 31:698-700.
- Cassatella, M.A., L. Meda, S. Gasperini, F. Calzetti, and S. Bonora. 1994. Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. *J Exp Med.* 179:1695-1699.
- Caudrillier, A., K. Kessenbrock, B.M. Gilliss, J.X. Nguyen, M.B. Marques, M. Monestier, P. Toy, Z. Werb, and M.R. Looney. 2012. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest.* 122:2661-2671.
- Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, and J. Banchereau. 1992. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature.* 360:258-261.
- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, I. Durand, M. Cella, A. Lanzavecchia, and J. Banchereau. 1997. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood.* 90:1458-1470.
- Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. de Saint-Vis, C. Jacquet, K. Yoneda, S. Imamura, D. Schmitt, and J. Banchereau. 1996a. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med.* 184:695-706.
- Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, I. Durand, and J. Banchereau. 1996b. Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 87:2376-2385.
- Charmoy, M., S. Brunner-Agten, D. Aebischer, F. Auderset, P. Launois, G. Milon, A.E. Proudfoot, and F. Tacchini-Cottier. 2010. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of Leishmania major inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog.* 6:e1000755.
- Chen, K., H. Nishi, R. Travers, N. Tsuboi, K. Martinod, D.D. Wagner, R. Stan, K. Croce, and T.N. Mayadas. 2012. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by Fc gammaRIIB but induces neutrophil extracellular traps via Fc gammaRIIA in vivo. *Blood.* 120:4421-4431.
- Cheng, O.Z., and N. Palaniyar. 2013. NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Front Immunol.* 4:1.
- Chiara, A.D., M. Pederzoli-Ribeil, P.R. Burgel, C. Danel, and V. Witko-Sarsat. 2012. Targeting cytosolic proliferating cell nuclear antigen in neutrophil-dominated inflammation. *Front Immunol.* 3:311.

- Choi, E.Y., E. Chavakis, M.A. Czabanka, H.F. Langer, L. Fraemohs, M. Economopoulou, R.K. Kundu, A. Orlandi, Y.Y. Zheng, D.A. Prieto, C.M. Ballantyne, S.L. Constant, W.C. Aird, T. Papayannopoulou, C.G. Gahmberg, M.C. Udey, P. Vajkoczy, T. Quertermous, S. Dimmeler, C. Weber, and T. Chavakis. 2008. Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor, limits inflammatory cell recruitment. *Science*. 322:1101-1104.
- Chow, O.A., M. von Kockritz-Blickwede, A.T. Bright, M.E. Hensler, A.S. Zinkernagel, A.L. Cogen, R.L. Gallo, M. Monestier, Y. Wang, C.K. Glass, and V. Nizet. 2010. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell Host Microbe*. 8:445-454.
- Christoffersson, G., J. Henriksnas, L. Johansson, C. Rolny, H. Ahlstrom, J. Caballero-Corbalan, R. Segersvard, J. Permert, O. Korsgren, P.O. Carlsson, and M. Phillipson. 2010. Clinical and experimental pancreatic islet transplantation to striated muscle: establishment of a vascular system similar to that in native islets. *Diabetes*. 59:2569-2578.
- Christoffersson, G., E. Vagesjo, J. Vandooren, M. Liden, S. Massena, R.B. Reinert, M. Brissova, A.C. Powers, G. Opdenakker, and M. Phillipson. 2012. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood*. 120:4653-4662.
- Chuammitri, P., J. Ostojic, C.B. Andreasen, S.B. Redmond, S.J. Lamont, and D. Palic. 2009. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. *Vet Immunol Immunopathol*. 129:126-131.
- Chuang, C.Y., T.G. Chen, Y.T. Tai, T.L. Chen, Y.H. Lin, C.H. Tsai, and R.M. Chen. 2011. Toll-like receptor 2-mediated sequential activation of MyD88 and MAPKs contributes to lipopolysaccharide-induced sp-a gene expression in human alveolar epithelial cells. *Immunobiology*. 216:707-714.
- Clark, S.R., A.C. Ma, S.A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M.M. Kelly, K.D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G.D. Sinclair, E.M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Devinney, C.J. Doig, F.H. Green, and P. Kubes. 2007. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 13:463-469.
- Clayton, A.R., R.L. Prue, L. Harper, M.T. Drayson, and C.O. Savage. 2003. Dendritic cell uptake of human apoptotic and necrotic neutrophils inhibits CD40, CD80, and CD86 expression and reduces allogeneic T cell responses: relevance to systemic vasculitis. *Arthritis Rheum*. 48:2362-2374.
- Cloke, T., M. Munder, G. Taylor, I. Muller, and P. Kropf. 2012. Characterization of a novel population of low-density granulocytes associated with disease severity in HIV-1 infection. *PLoS One*. 7:e48939.
- Cole, J.N., M.A. Pence, M. von Kockritz-Blickwede, A. Hollands, R.L. Gallo, M.J. Walker, and V. Nizet. 2010. M protein and hyaluronic acid capsule are essential for in vivo selection of covRS mutations characteristic of invasive serotype M1T1 group A Streptococcus. *MBio*. 1.
- Collin, M., V. Bigley, M. Haniffa, and S. Hambleton. 2011. Human dendritic cell deficiency: the missing ID? *Nat Rev Immunol*. 11:575-583.

- Collin, M., N. McGovern, and M. Haniffa. 2013. Human dendritic cell subsets. *Immunology*.
- Collin, M.P., D.N. Hart, G.H. Jackson, G. Cook, J. Cavet, S. Mackinnon, P.G. Middleton, and A.M. Dickinson. 2006. The fate of human Langerhans cells in hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med*. 203:27-33.
- Conway, K.L., G. Goel, H. Sokol, M. Manocha, E. Mizoguchi, C. Terhorst, A.K. Bhan, A. Gardet, and R.J. Xavier. 2012. p40phox expression regulates neutrophil recruitment and function during the resolution phase of intestinal inflammation. *J Immunol*. 189:3631-3640.
- Cools-Lartigue, J., J. Spicer, B. McDonald, S. Gowing, S. Chow, B. Giannias, F. Bourdeau, P. Kubes, and L. Ferri. 2013. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*.
- Cooper, P.R., L.J. Palmer, and I.L. Chapple. 2013. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? *Periodontol 2000*. 63:165-197.
- Costantini, C., and M.A. Cassatella. 2011. The defensive alliance between neutrophils and NK cells as a novel arm of innate immunity. *J Leukoc Biol*. 89:221-233.
- Crotty, S. 2011. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 29:621-663.
- Csernok, E., M. Ai, W.L. Gross, D. Wicklein, A. Petersen, B. Lindner, P. Lamprecht, J.U. Holle, and B. Hellmich. 2006. Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway. *Blood*. 107:4440-4448.
- Dalli, J., C.P. Jones, D.M. Cavalcanti, S.H. Farsky, M. Perretti, and S.M. Rankin. 2012. Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow. *FASEB J*. 26:387-396.
- Dang, P.M., H. Raad, R.A. Derkawi, T. Boussetta, M.H. Paclet, S.A. Belambri, K. Makni-Maalej, Y. Kroviarski, F. Morel, M.A. Gougerot-Pocidallo, and J. El-Benna. 2011. The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochem Pharmacol*. 82:1145-1152.
- Darrah, E., and F. Andrade. 2012. NETs: the missing link between cell death and systemic autoimmune diseases? *Front Immunol*. 3:428.
- Davey, M.S., N. Tamassia, M. Rossato, F. Bazzoni, F. Calzetti, K. Bruderek, M. Sironi, L. Zimmer, B. Bottazzi, A. Mantovani, S. Brandau, B. Moser, M. Eberl, and M.A. Cassatella. 2011. Failure to detect production of IL-10 by activated human neutrophils. *Nat Immunol*. 12:1017-1018; author reply 1018-1020.
- Davidson, D.J., A.J. Currie, G.S. Reid, D.M. Bowdish, K.L. MacDonald, R.C. Ma, R.E. Hancock, and D.P. Speert. 2004. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol*. 172:1146-1156.
- de Chaisemartin, L., G. Hayemb, and S. Chollet-Martin. 2013. When neutrophils cast their nets. *Joint Bone Spine*. 80:124-126.
- de la Rosa, G., D. Yang, P. Tewary, A. Varadhachary, and J.J. Oppenheim. 2008. Lactoferrin acts as an alarmin to promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses. *J Immunol*. 180:6868-6876.

- De Santo, C., R. Arscott, S. Booth, I. Karydis, M. Jones, R. Asher, M. Salio, M. Middleton, and V. Cerundolo. 2010. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol.* 11:1039-1046.
- Deane, K.D., J.M. Norris, and V.M. Holers. 2010. Preclinical rheumatoid arthritis: identification, evaluation, and future directions for investigation. *Rheum Dis Clin North Am.* 36:213-241.
- Deban, L., R.C. Russo, M. Sironi, F. Moalli, M. Scanziani, V. Zambelli, I. Cuccovillo, A. Bastone, M. Gobbi, S. Valentino, A. Doni, C. Garlanda, S. Danese, G. Salvatori, M. Sassano, V. Evangelista, B. Rossi, E. Zenaro, G. Constantin, C. Laudanna, B. Bottazzi, and A. Mantovani. 2010. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nat Immunol.* 11:328-334.
- Delbosc, S., J.M. Alsac, C. Journe, L. Louedec, Y. Castier, M. Bonneure-Mallet, R. Ruimy, P. Rossignol, P. Bouchard, J.B. Michel, and O. Meilhac. 2011. Porphyromonas gingivalis participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLoS One.* 6:e18679.
- Demers, M., D.S. Krause, D. Schatzberg, K. Martinod, J.R. Voorhees, T.A. Fuchs, D.T. Scadden, and D.D. Wagner. 2012. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:13076-13081.
- Demers, M., and D.D. Wagner. 2013. Neutrophil extracellular traps: A new link to cancer-associated thrombosis and potential implications for tumor progression. *Oncoimmunology.* 2:e22946.
- Desjardins, A., H. Coignard-Biehler, N. Mahlaoui, P. Frange, M.E. Bougnoux, S. Blanche, A. Fischer, S. Blumental, and O. Lortholary. 2012. [Chronic granulomatous disease: pathogenesis and therapy of associated fungal infections]. *Med Sci (Paris).* 28:963-969.
- Di Nardo, A., M.H. Braff, K.R. Taylor, C. Na, R.D. Granstein, J.E. McInturff, S. Krutzik, R.L. Modlin, and R.L. Gallo. 2007. Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization. *J Immunol.* 178:1829-1834.
- Diamantopoulos, A.P. 2013. Extracellular neutrophil traps: a novel therapeutic target in ANCA-associated vasculitis? *Front Immunol.* 4:24.
- Diana, J., Y. Simoni, L. Furio, L. Beaudoin, B. Agerberth, F. Barrat, and A. Lehuen. 2013. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nat Med.* 19:65-73.
- Dimasi, D., W.Y. Sun, and C.S. Bonder. 2013. Neutrophil interactions with the vascular endothelium. *Int Immunopharmacol.*
- Doherty, G.J., and H.T. McMahon. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 78:857-902.
- Doring, Y., M. Drechsler, S. Wantha, K. Kemmerich, D. Lievens, S. Vijayan, R.L. Gallo, C. Weber, and O. Soehnlein. 2012. Lack of neutrophil-derived CRAMP reduces atherosclerosis in mice. *Circ Res.* 110:1052-1056.

- Dorner, T. 2012. SLE in 2011: Deciphering the role of NETs and networks in SLE. *Nat Rev Rheumatol.* 8:68-70.
- Douda, D.N., R. Jackson, H. Craig-Barnes, H. Grasemann, and , and N. Palaniyar. 2011a. Surfactant protein D augments neutrophil extracellular trap function and their clearance by alveolar macrophages. *In Am. J. Respir. Crit. Care Med.*
- Douda, D.N., R. Jackson, H. Grasemann, and N. Palaniyar. 2011b. Innate immune collectin surfactant protein D simultaneously binds both neutrophil extracellular traps and carbohydrate ligands and promotes bacterial trapping. *J Immunol.* 187:1856-1865.
- Doulatov, S., F. Notta, K. Eppert, L.T. Nguyen, P.S. Ohashi, and J.E. Dick. 2010. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol.* 11:585-593.
- Drago-Serrano, M.E., M. de la Garza-Amaya, J.S. Luna, and R. Campos-Rodriguez. 2012. Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. *Int Immunopharmacol.* 12:1-9.
- Drechsler, M., Y. Doring, R.T. Megens, and O. Soehnlein. 2011. Neutrophilic granulocytes - promiscuous accelerators of atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 106:839-848.
- Drenou, B., L. Amiot, N. Setterblad, S. Taque, V. Guilloux, D. Charron, R. Fauchet, and N. Mooney. 2005. MHC class II signaling function is regulated during maturation of plasmacytoid dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 77:560-567.
- Drescher, B., and F. Bai. 2013. Neutrophil in viral infections, friend or foe? *Virus Res.* 171:1-7.
- Dubois, A.V., A. Gauthier, D. Brea, F. Varaigne, P. Diot, F. Gauthier, and S. Attucci. 2012. Influence of DNA on the activities and inhibition of neutrophil serine proteases in cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 47:80-86.
- Dumas, A., S. Lagarde, C. Laflamme, and M. Pouliot. 2012. Oncostatin M decreases interleukin-1 beta secretion by human synovial fibroblasts and attenuates an acute inflammatory reaction in vivo. *J Cell Mol Med.* 16:1274-1285.
- Dwivedi, N., J. Upadhyay, I. Neeli, S. Khan, D. Pattanaik, L. Myers, K.A. Kirou, B. Hellmich, B. Knuckley, P.R. Thompson, M.K. Crow, T.R. Mikuls, E. Csernok, and M. Radic. 2012. Felty's syndrome autoantibodies bind to deiminated histones and neutrophil extracellular chromatin traps. *Arthritis Rheum.* 64:982-992.
- Dworski, R., H.U. Simon, A. Hoskins, and S. Yousefi. 2011. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol.* 127:1260-1266.
- Dzionic, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D.W. Buck, and J. Schmitz. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 165:6037-6046.
- Eash, K.J., A.M. Greenbaum, P.K. Gopalan, and D.C. Link. 2010. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest.* 120:2423-2431.

- Eken, C., O. Gasser, G. Zenhausern, I. Oehri, C. Hess, and J.A. Schifferli. 2008. Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 180:817-824.
- Eken, C., P.J. Martin, S. Sadallah, S. Treves, M. Schaller, and J.A. Schifferli. 2010. Ectosomes released by polymorphonuclear neutrophils induce a MerTK-dependent anti-inflammatory pathway in macrophages. *J Biol Chem.* 285:39914-39921.
- Ekman, A.K., and L.O. Cardell. 2010. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology.* 130:55-63.
- El-Benna, J., P.M. Dang, and M.A. Gougerot-Pocidallo. 2008. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol.* 30:279-289.
- El-Benna, J., P.M. Dang, M.A. Gougerot-Pocidallo, J.C. Marie, and F. Braut-Boucher. 2009. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med.* 41:217-225.
- El-Kebir, D., and J.G. Filep. 2013. Targeting Neutrophil Apoptosis for Enhancing the Resolution of Inflammation. *Cells.* 2:330-348.
- El Kebir, D., P. Gjorstrup, and J.G. Filep. 2012. Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:14983-14988.
- El Kebir, D., L. Jozsef, W. Pan, L. Wang, N.A. Petasis, C.N. Serhan, and J.G. Filep. 2009. 15-epi-lipoxin A4 inhibits myeloperoxidase signaling and enhances resolution of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 180:311-319.
- Elks, P.M., F.J. van Eeden, G. Dixon, X. Wang, C.C. Reyes-Aldasoro, P.W. Ingham, M.K. Whyte, S.R. Walmsley, and S.A. Renshaw. 2011. Activation of hypoxia-inducible factor-1alpha (Hif-1alpha) delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model. *Blood.* 118:712-722.
- Encabo, A., P. Solves, E. Mateu, P. Sepulveda, F. Carbonell-Uberos, and M.D. Minana. 2004. Selective generation of different dendritic cell precursors from CD34+ cells by interleukin-6 and interleukin-3. *Stem Cells.* 22:725-740.
- Ermert, D., C.F. Urban, B. Laube, C. Goosmann, A. Zychlinsky, and V. Brinkmann. 2009. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J Innate Immun.* 1:181-193.
- Fancke, B., and M. O'Keeffe. 2013. Monitoring dendritic cell activation and maturation. *Methods Mol Biol.* 960:359-370.
- Fang, W.H., Y.M. Yao, Z.G. Shi, Y. Yu, Y. Wu, L.R. Lu, and Z.Y. Sheng. 2001. Effect of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein on endotoxin translocation and lipopolysaccharide-binding protein/CD14 expression in rats after thermal injury. *Crit Care Med.* 29:1452-1459.
- Farley, K., J.M. Stolley, P. Zhao, J. Cooley, and E. Remold-O'Donnell. 2012. A serpinB1 regulatory mechanism is essential for restricting neutrophil extracellular trap generation. *J Immunol.* 189:4574-4581.

- Faurschou, M., and N. Borregaard. 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 5:1317-1327.
- Flannagan, R.S., V. Jaumouille, and S. Grinstein. 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol.* 7:61-98.
- Fonteneau, J.F., M. Gilliet, M. Larsson, I. Dasilva, C. Munz, Y.J. Liu, and N. Bhardwaj. 2003. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood.* 101:3520-3526.
- Fooksman, D.R., S. Vardhana, G. Vasiliver-Shamis, J. Liese, D.A. Blair, J. Waite, C. Sacristan, G.D. Victora, A. Zanin-Zhorov, and M.L. Dustin. 2010. Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu Rev Immunol.* 28:79-105.
- Fridlender, Z.G., J. Sun, S. Kim, V. Kapoor, G. Cheng, L. Ling, G.S. Worthen, and S.M. Albelda. 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell.* 16:183-194.
- Fuchs, H.J., D.S. Borowitz, D.H. Christiansen, E.M. Morris, M.L. Nash, B.W. Ramsey, B.J. Rosenstein, A.L. Smith, and M.E. Wohl. 1994. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med.* 331:637-642.
- Fuchs, T.A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 176:231-241.
- Fuchs, T.A., A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D.D. Myers, Jr., S.K. Wroblewski, T.W. Wakefield, J.H. Hartwig, and D.D. Wagner. 2010. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:15880-15885.
- Fuchs, T.A., J.A. Kremer Hovinga, D. Schatzberg, D.D. Wagner, and B. Lammle. 2012. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood.* 120:1157-1164.
- Fujita, H., K.E. Nogales, T. Kikuchi, J. Gonzalez, J.A. Carucci, and J.G. Krueger. 2009. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:21795-21800.
- Fukao, T., and S. Koyasu. 2003. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol.* 24:358-363.
- Fukao, T., M. Tanabe, Y. Terauchi, T. Ota, S. Matsuda, T. Asano, T. Kadowaki, T. Takeuchi, and S. Koyasu. 2002. PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat Immunol.* 3:875-881.
- Furio, L., I. Briotet, A. Journeaux, H. Billard, and J. Peguet-Navarro. 2010. Human langerhans cells are more efficient than CD14(-)CD1c(+) dermal dendritic cells at priming naive CD4(+) T cells. *J Invest Dermatol.* 130:1345-1354.
- Gabelloni, M.L., F. Sabbione, C. Jancic, J. Fuxman Bass, I. Keitelman, L. Iula, M. Oleastro, J.R. Geffner, and A.S. Trevani. 2013a. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are involved in human neutrophil IL-1beta secretion but not in inflammasome activation. *Eur J Immunol.*

- Gabelloni, M.L., A.S. Trevani, J. Sabatte, and J. Geffner. 2013b. Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death. *Semin Immunopathol.* 35:423-437.
- Gabriel, C., W.R. McMaster, D. Girard, and A. Descoteaux. 2010. Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *J Immunol.* 185:4319-4327.
- Garcia-Garcia, E., G. Nieto-Castaneda, M. Ruiz-Saldana, N. Mora, and C. Rosales. 2009. FcγRIIA and FcγRIIIB mediate nuclear factor activation through separate signaling pathways in human neutrophils. *J Immunol.* 182:4547-4556.
- Garcia-Romo, G.S., S. Caielli, B. Vega, J. Connolly, F. Allantaz, Z. Xu, M. Punaro, J. Baisch, C. Guiducci, R.L. Coffman, F.J. Barrat, J. Banchereau, and V. Pascual. 2011. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 3:73ra20.
- Gardella, S., C. Andrei, D. Ferrera, L.V. Lotti, M.R. Torrisi, M.E. Bianchi, and A. Rubartelli. 2002. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.* 3:995-1001.
- Gasparini, C., B.M. Foxwell, and M. Feldmann. 2013. RelB/p50 regulates TNF production in LPS-stimulated dendritic cells and macrophages. *Cytokine.* 61:736-740.
- Gasser, O., and J.A. Schifferli. 2004. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood.* 104:2543-2548.
- Gaudry, M., O. Bregerie, V. Andrieu, J. El Benna, M.A. Pocard, and J. Hakim. 1997. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood.* 90:4153-4161.
- Geissmann, F., C. Prost, J.P. Monnet, M. Dy, N. Brousse, and O. Hermine. 1998. Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med.* 187:961-966.
- Gelin, C., I. Sloma, D. Charron, and N. Mooney. 2009. Regulation of MHC II and CD1 antigen presentation: from ubiquity to security. *J Leukoc Biol.* 85:215-224.
- Geng, S., H. Matsushima, T. Okamoto, Y. Yao, R. Lu, K. Page, R.M. Blumenthal, N.L. Ward, T. Miyazaki, and A. Takashima. 2013. Emergence, origin, and function of neutrophil-dendritic cell hybrids in experimentally induced inflammatory lesions in mice. *Blood.* 121:1690-1700.
- Ginhoux, F., and M. Merad. 2010. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunol Cell Biol.* 88:387-392.
- Goldmann, O., and E. Medina. 2012. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol.* 3:420.
- Gong, Y., and D.R. Koh. 2010. Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model. *Cell Tissue Res.* 339:437-448.

- Graham, D.B., L.M. Stephenson, S.K. Lam, K. Brim, H.M. Lee, J. Bautista, S. Gilfillan, S. Akilesh, K. Fujikawa, and W. Swat. 2007. An ITAM-signaling pathway controls cross-presentation of particulate but not soluble antigens in dendritic cells. *J Exp Med.* 204:2889-2897.
- Greenblatt, M.B., A. Aliprantis, B. Hu, and L.H. Glimcher. 2010. Calcineurin regulates innate antifungal immunity in neutrophils. *J Exp Med.* 207:923-931.
- Grenier, A., S. Chollet-Martin, B. Crestani, C. Delarche, J. El Benna, A. Boutten, V. Andrieu, G. Durand, M.A. Gougerot-Pocidallo, M. Aubier, and M. Dehoux. 2002. Presence of a mobilizable intracellular pool of hepatocyte growth factor in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood.* 99:2997-3004.
- Grenier, A., D. Combaut, J. Chastre, M.A. Gougerot-Pocidallo, C. Gibert, M. Dehoux, and S. Chollet-Martin. 2001. Oncostatin M production by blood and alveolar neutrophils during acute lung injury. *Lab Invest.* 81:133-141.
- Grenier, A., M. Dehoux, A. Boutten, M. Arce-Vicioso, G. Durand, M.A. Gougerot-Pocidallo, and S. Chollet-Martin. 1999. Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear neutrophils. *Blood.* 93:1413-1421.
- Gresnigt, M.S., L.A. Joosten, I. Verschueren, J.W. van der Meer, M.G. Netea, C.A. Dinarello, and F.L. van de Veerdonk. 2012. Neutrophil-mediated inhibition of proinflammatory cytokine responses. *J Immunol.* 189:4806-4815.
- Grommes, J., and O. Soehnlein. 2011. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med.* 17:293-307.
- Guha, M., and N. Mackman. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem.* 277:32124-32132.
- Guimaraes-Costa, A.B., M.T. Nascimento, G.S. Froment, R.P. Soares, F.N. Morgado, F. Conceicao-Silva, and E.M. Saraiva. 2009. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:6748-6753.
- Guimaraes-Costa, A.B., M.T. Nascimento, A.B. Wardini, L.H. Pinto-da-Silva, and E.M. Saraiva. 2012. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J Parasitol Res.* 2012:929743.
- Gunther, C., J. Starke, N. Zimmermann, and K. Schakel. 2012. Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells are a major population of dermal dendritic cells in steady state and inflammation. *Clin Exp Dermatol.* 37:169-176.
- Gupta, A.K., P. Hasler, W. Holzgreve, and S. Hahn. 2007. Neutrophil NETs: a novel contributor to preeclampsia-associated placental hypoxia? *Semin Immunopathol.* 29:163-167.
- Gupta, A.K., M.B. Joshi, M. Philippova, P. Erne, P. Hasler, S. Hahn, and T.J. Resink. 2010. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.* 584:3193-3197.
- Hakkim, A., T.A. Fuchs, N.E. Martinez, S. Hess, H. Prinz, A. Zychlinsky, and H. Waldmann. 2011. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol.* 7:75-77.

- Hakim, A., B.G. Furnrohr, K. Amann, B. Laube, U.A. Abed, V. Brinkmann, M. Herrmann, R.E. Voll, and A. Zychlinsky. 2010. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:9813-9818.
- Haniffa, M., M. Collin, and F. Ginhoux. 2013. Identification of human tissue cross-presenting dendritic cells: A new target for cancer vaccines. *Oncoimmunology*. 2:e23140.
- Haniffa, M., F. Ginhoux, X.N. Wang, V. Bigley, M. Abel, I. Dimmick, S. Bullock, M. Grisotto, T. Booth, P. Taub, C. Hilkens, M. Merad, and M. Collin. 2009. Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med*. 206:371-385.
- Haniffa, M., A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P.S. Wasan, X.N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R.F. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J.K. Chan, A. Gehring, A. Bertolotti, M. Collin, and F. Ginhoux. 2012. Human tissues contain CD141<sup>hi</sup> cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103<sup>+</sup> nonlymphoid dendritic cells. *Immunity*. 37:60-73.
- Hansel, A., C. Gunther, W. Baran, M. Bidier, H.M. Lorenz, M. Schmitz, M. Bachmann, T. Dobel, A.H. Enk, and K. Schakel. 2013. Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells have molecular and functional features of an important pro-inflammatory cell type in lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 40:1-8.
- Hansel, A., C. Gunther, J. Ingwersen, J. Starke, M. Schmitz, M. Bachmann, M. Meurer, E.P. Rieber, and K. Schakel. 2011. Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses. *J Allergy Clin Immunol*. 127:787-794 e781-789.
- Hauser, A.R., M. Jain, M. Bar-Meir, and S.A. McColley. 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 24:29-70.
- Hawes, M.C., G. Curlango-Rivera, F. Wen, G.J. White, H.D. Vanetten, and Z. Xiong. 2011. Extracellular DNA: the tip of root defenses? *Plant Sci*. 180:741-745.
- Hemmers, S., J.R. Teijaro, S. Arandjelovic, and K.A. Mowen. 2011. PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. *PLoS One*. 6:e22043.
- Hespel, C., and M. Moser. 2012. Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol*. 42:2535-2543.
- Hess, C., S. Sadallah, A. Hefti, R. Landmann, and J.A. Schifferli. 1999. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol*. 163:4564-4573.
- Hinz, A., and R. Tampe. 2012. ABC transporters and immunity: mechanism of self-defense. *Biochemistry*. 51:4981-4989.
- Hoces de la Guardia, A., C. Staedel, I. Kaafarany, A. Clement, C. Roubaud Baudron, F. Megraud, and P. Lehours. 2013. Inflammatory cytokine and microRNA responses of primary human dendritic cells cultured with *Helicobacter pylori* strains. *Front Microbiol*. 4:236.

- Horman, S.R., C.S. Velu, A. Chaubey, T. Bourdeau, J. Zhu, W.E. Paul, B. Gebelein, and H.L. Grimes. 2009. Gfi1 integrates progenitor versus granulocytic transcriptional programming. *Blood*. 113:5466-5475.
- Huang, H., J. Evankovich, W. Yan, G. Nace, L. Zhang, M. Ross, X. Liao, T. Billiar, J. Xu, C.T. Esmon, and A. Tsung. 2011. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology*. 54:999-1008.
- Huang, J., V. Canadien, G.Y. Lam, B.E. Steinberg, M.C. Dinauer, M.A. Magalhaes, M. Glogauer, S. Grinstein, and J.H. Brummel. 2009. Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:6226-6231.
- Huggins, J.T., P. Doelken, and S.A. Sahn. 2011. Intrapleural therapy. *Respirology*. 16:891-899.
- Hurtado-Nedelec, M., M.J. Csillag-Grange, T. Boussetta, S.A. Belambri, M. Fay, B. Cassinat, M.A. Gougerot-Pocidal, P.M. Dang, and J. El-Benna. 2013. Increased reactive oxygen species production and p47phox phosphorylation in neutrophils from myeloproliferative disorders patients with JAK2 (V617F) mutation. *Haematologica*.
- Iliopoulos, D., H.A. Hirsch, and K. Struhl. 2009. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell*. 139:693-706.
- Ishii, M., K. Asano, H. Namkoong, S. Tasaka, K. Mizoguchi, T. Asami, H. Kamata, Y. Kimizuka, H. Fujiwara, Y. Funatsu, S. Kagawa, J. Miyata, K. Ishii, M. Nakamura, H. Hirai, K. Nagata, S.L. Kunkel, N. Hasegawa, and T. Betsuyaku. 2012. CTRH2 is a critical regulator of neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *J Immunol*. 188:5655-5664.
- Ismail, H.F., P. Fick, J. Zhang, R.G. Lynch, and D.J. Berg. 2003. Depletion of neutrophils in IL-10(-/-) mice delays clearance of gastric Helicobacter infection and decreases the Th1 immune response to Helicobacter. *J Immunol*. 170:3782-3789.
- Jaeger, B.N., J. Donadieu, C. Cognet, C. Bernat, D. Ordonez-Rueda, V. Barlogis, N. Mahlaoui, A. Fenis, E. Narni-Mancinelli, B. Beaupain, C. Bellanne-Chantelot, M. Bajenoff, B. Malissen, M. Malissen, E. Vivier, and S. Ugolini. 2012. Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med*. 209:565-580.
- Jaeschke, H. 2011. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroenterol Hepatol*. 26 Suppl 1:173-179.
- Jahnisch, H., R. Wehner, A. Tunger, A. Kunze, S. Oehrl, K. Schakel, J. Rohayem, M. Bornhauser, T. Tonn, M. Bachmann, and M. Schmitz. 2013. TLR7/8 agonists trigger immunostimulatory properties of human 6-sulfo LacNAc dendritic cells. *Cancer Lett*. 335:119-127.
- Jaillon, S., M.R. Galdiero, D. Del Prete, M.A. Cassatella, C. Garlanda, and A. Mantovani. 2013. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol*.
- Jaillon, S., G. Peri, Y. Delneste, I. Fremaux, A. Doni, F. Moalli, C. Garlanda, L. Romani, H. Gascan, S. Bellocchio, S. Bozza, M.A. Cassatella, P. Jeannin, and A.

- Mantovani. 2007. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med.* 204:793-804.
- Jancic, C., A. Savina, C. Wasmeier, T. Tolmachova, J. El-Benna, P.M. Dang, S. Pascolo, M.A. Gougerot-Pocidallo, G. Raposo, M.C. Seabra, and S. Amigorena. 2007. Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat Cell Biol.* 9:367-378.
- Jenne, C.N., C.H. Wong, F.J. Zemp, B. McDonald, M.M. Rahman, P.A. Forsyth, G. McFadden, and P. Kubers. 2013. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe.* 13:169-180.
- Jo, E.K., J.M. Yuk, D.M. Shin, and C. Sasakawa. 2013. Roles of autophagy in elimination of intracellular bacterial pathogens. *Front Immunol.* 4:97.
- Joffre, O., M.A. Nolte, R. Sporri, and C. Reis e Sousa. 2009. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev.* 227:234-247.
- Jog, N.R., M.J. Rane, G. Lominadze, G.C. Luerman, R.A. Ward, and K.R. McLeish. 2007. The actin cytoskeleton regulates exocytosis of all neutrophil granule subsets. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292:C1690-1700.
- Jongbloed, S.L., A.J. Kassianos, K.J. McDonald, G.J. Clark, X. Ju, C.E. Angel, C.J. Chen, P.R. Dunbar, R.B. Wadley, V. Jeet, A.J. Vulink, D.N. Hart, and K.J. Radford. 2010. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med.* 207:1247-1260.
- Jonsson, F., D.A. Mancardi, Y. Kita, H. Karasuyama, B. Iannascoli, N. Van Rooijen, T. Shimizu, M. Dairon, and P. Bruhns. 2011. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J Clin Invest.* 121:1484-1496.
- Jonsson, F., D.A. Mancardi, W. Zhao, Y. Kita, B. Iannascoli, H. Khun, N. van Rooijen, T. Shimizu, L.B. Schwartz, M. Dairon, and P. Bruhns. 2012. Human FcγRIIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood.* 119:2533-2544.
- Jozsef, L., C. Zouki, N.A. Petasis, C.N. Serhan, and J.G. Filep. 2002. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-κB and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:13266-13271.
- Juneau, R.A., B. Pang, K.E. Weimer, C.E. Armbruster, and W.E. Swords. 2011. Nontypeable *Haemophilus influenzae* initiates formation of neutrophil extracellular traps. *Infect Immun.* 79:431-438.
- Kaisho, T. 2012. Pathogen sensors and chemokine receptors in dendritic cell subsets. *Vaccine.* 30:7652-7657.
- Kalinski, P., C.M. Hilkens, E.A. Wierenga, and M.L. Kapsenberg. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today.* 20:561-567.
- Kambas, K., I. Mitroulis, E. Apostolidou, A. Girod, A. Chrysanthopoulou, I. Pneumatikos, P. Skendros, I. Kourtzelis, M. Koffa, I. Kotsianidis, and K. Ritis. 2012a.

- Autophagy mediates the delivery of thrombogenic tissue factor to neutrophil extracellular traps in human sepsis. *PLoS One*. 7:e45427.
- Kambas, K., I. Mitroulis, and K. Ritis. 2012b. The emerging role of neutrophils in thrombosis-the journey of TF through NETs. *Front Immunol*. 3:385.
- Kandler, K., R. Shaykhiev, P. Kleemann, F. Kleszcz, M. Lohoff, C. Vogelmeier, and R. Bals. 2006. The anti-microbial peptide LL-37 inhibits the activation of dendritic cells by TLR ligands. *Int Immunol*. 18:1729-1736.
- Kanitakis, J., E. Morelon, P. Petruzzo, L. Badet, and J.M. Dubernard. 2011. Self-renewal capacity of human epidermal Langerhans cells: observations made on a composite tissue allograft. *Exp Dermatol*. 20:145-146.
- Kannengiesser, C., B. Gerard, J. El Benna, D. Henri, Y. Kroviarski, S. Chollet-Martin, M.A. Gougerot-Pocidalò, C. Elbim, and B. Grandchamp. 2008. Molecular epidemiology of chronic granulomatous disease in a series of 80 kindreds: identification of 31 novel mutations. *Hum Mutat*. 29:E132-149.
- Kaplan, D.H. 2010. In vivo function of Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Trends Immunol*. 31:446-451.
- Kaplan, M.J., and M. Radic. 2012. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol*. 189:2689-2695.
- Keeshan, K., G. Santilli, F. Corradini, D. Perrotti, and B. Calabretta. 2003. Transcription activation function of C/EBPalpha is required for induction of granulocytic differentiation. *Blood*. 102:1267-1275.
- Kempf, T., A. Zarbock, C. Widera, S. Butz, A. Stadtman, J. Rossaint, M. Bolomini-Vittori, M. Korf-Klingebiel, L.C. Napp, B. Hansen, A. Kanwischer, U. Bavendiek, G. Beutel, M. Hapke, M.G. Sauer, C. Laudanna, N. Hogg, D. Vestweber, and K.C. Wollert. 2011. GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nat Med*. 17:581-588.
- Khandpur, R., C. Carmona-Rivera, A. Vivekanandan-Giri, A. Gizinski, S. Yalavarthi, J.S. Knight, S. Friday, S. Li, R.M. Patel, V. Subramanian, P. Thompson, P. Chen, D.A. Fox, S. Pennathur, and M.J. Kaplan. 2013. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 5:178ra140.
- Kirchner, T., S. Moller, M. Klinger, W. Solbach, T. Laskay, and M. Behnen. 2012. The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps. *Mediators Inflamm*. 2012:849136.
- Klechevsky, E., and J. Banchereau. 2013. Human dendritic cells subsets as targets and vectors for therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 1284:24-30.
- Klechevsky, E., R. Morita, M. Liu, Y. Cao, S. Coquery, L. Thompson-Snipes, F. Briere, D. Chaussabel, G. Zurawski, A.K. Palucka, Y. Reiter, J. Banchereau, and H. Ueno. 2008. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity*. 29:497-510.
- Knight, J.S., C. Carmona-Rivera, and M.J. Kaplan. 2012. Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. *Front Immunol*. 3:380.

- Kolaczowska, E., and P. Kubes. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 13:159-175.
- Kotsias, F., E. Hoffmann, S. Amigorena, and A. Savina. 2013. Reactive oxygen species production in the phagosome: impact on antigen presentation in dendritic cells. *Antioxid Redox Signal.* 18:714-729.
- Kreisel, D., R.G. Nava, W. Li, B.H. Zinselmeyer, B. Wang, J. Lai, R. Pless, A.E. Gelman, A.S. Krupnick, and M.J. Miller. 2010. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:18073-18078.
- Kushwah, R., and J. Hu. 2011. Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell Biosci.* 1:20.
- Laird, M.H., S.H. Rhee, D.J. Perkins, A.E. Medvedev, W. Piao, M.J. Fenton, and S.N. Vogel. 2009. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *J Leukoc Biol.* 85:966-977.
- Lammermann, T., P.V. Afonso, B.R. Angermann, J.M. Wang, W. Kastner, C.A. Parent, and R.N. Germain. 2013. Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature.* 498:371-375.
- Lande, R., D. Ganguly, V. Facchinetti, L. Frasca, C. Conrad, J. Gregorio, S. Meller, G. Chamilos, R. Sebasigari, V. Ricciari, R. Bassett, H. Amuro, S. Fukuhara, T. Ito, Y.J. Liu, and M. Gilliet. 2011. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 3:73ra19.
- Lande, R., J. Gregorio, V. Facchinetti, B. Chatterjee, Y.H. Wang, B. Homey, W. Cao, B. Su, F.O. Nestle, T. Zal, I. Mellman, J.M. Schroder, Y.J. Liu, and M. Gilliet. 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 449:564-569.
- Lapponi, M.J., A. Carestia, V.I. Landoni, L. Rivadeneyra, J. Etulain, S. Negrotto, R.G. Pozner, and M. Schattner. 2013. Regulation of neutrophil extracellular trap formation by anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 345:430-437.
- Lauth, X., M. von Kockritz-Blickwede, C.W. McNamara, S. Myskowski, A.S. Zinkernagel, B. Beall, P. Ghosh, R.L. Gallo, and V. Nizet. 2009. M1 protein allows Group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. *J Innate Immun.* 1:202-214.
- Le-Barillec, K., M. Si-Tahar, V. Balloy, and M. Chignard. 1999. Proteolysis of monocyte CD14 by human leukocyte elastase inhibits lipopolysaccharide-mediated cell activation. *J Clin Invest.* 103:1039-1046.
- Le Gars, M., D. Descamps, D. Roussel, E. Saussereau, L. Guillot, M. Ruffin, O. Tabary, S.S. Hong, P. Boulanger, M. Paulais, L. Malleret, A. Belaouaj, A. Edelman, M. Huerre, M. Chignard, and J.M. Sallenave. 2013. Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med.* 187:170-179.
- Lee, A.W., T. Truong, K. Bickham, J.F. Fonteneau, M. Larsson, I. Da Silva, S. Somersan, E.K. Thomas, and N. Bhardwaj. 2002. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine.* 20 Suppl 4:A8-A22.

- Lee, Y., A. Awasthi, N. Yosef, F.J. Quintana, S. Xiao, A. Peters, C. Wu, M. Kleinewietfeld, S. Kunder, D.A. Hafler, R.A. Sobel, A. Regev, and V.K. Kuchroo. 2012. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol.* 13:991-999.
- Leffler, J., B. Gullstrand, A. Jonsen, J.A. Nilsson, M. Martin, A.M. Blom, and A.A. Bengtsson. 2013. Degradation of neutrophil extracellular traps co-varies with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 15:R84.
- Leffler, J., M. Martin, B. Gullstrand, H. Tyden, C. Lood, L. Truedsson, A.A. Bengtsson, and A.M. Blom. 2012. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol.* 188:3522-3531.
- Lefrancais, E., S. Roga, V. Gautier, A. Gonzalez-de-Peredo, B. Monsarrat, J.P. Girard, and C. Cayrol. 2012. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:1673-1678.
- Leitch, A.E., C.D. Lucas, J.A. Marwick, R. Duffin, C. Haslett, and A.G. Rossi. 2012. Cyclin-dependent kinases 7 and 9 specifically regulate neutrophil transcription and their inhibition drives apoptosis to promote resolution of inflammation. *Cell Death Differ.* 19:1950-1961.
- Lemaitre, B. 2004. The road to Toll. *Nat Rev Immunol.* 4:521-527.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann. 2012. Pillars article: the dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell.* 1996. 86: 973-983. *J Immunol.* 188:5210-5220.
- Lennon-Dumenil, A.M., A.H. Bakker, R. Maehr, E. Fiebiger, H.S. Overkleeft, M. Roseblatt, H.L. Ploegh, and C. Lagaudriere-Gesbert. 2002. Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J Exp Med.* 196:529-540.
- Li, G.H., Y. Mine, M.T. Hincke, and Y. Nys. 2007. Isolation and characterization of antimicrobial proteins and peptide from chicken liver. *J Pept Sci.* 13:368-378.
- Li, P., M. Li, M.R. Lindberg, M.J. Kennett, N. Xiong, and Y. Wang. 2010. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 207:1853-1862.
- Liao, W., J.X. Lin, L. Wang, P. Li, and W.J. Leonard. 2011. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat Immunol.* 12:551-559.
- Lillard, J.W., Jr., P.N. Boyaka, O. Chertov, J.J. Oppenheim, and J.R. McGhee. 1999. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:651-656.
- Lim, M.B., J.W. Kuiper, A. Katchky, H. Goldberg, and M. Glogauer. 2011. Rac2 is required for the formation of neutrophil extracellular traps. *J Leukoc Biol.* 90:771-776.

- Lin, A.M., C.J. Rubin, R. Khandpur, J.Y. Wang, M. Riblett, S. Yalavarthi, E.C. Villanueva, P. Shah, M.J. Kaplan, and A.T. Bruce. 2011. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol.* 187:490-500.
- Lindell D., and L. N. 2010. Cytokines and chemokines in inflammation. *In* Fundamentals of inflammation. W.P. Serhan C., and Gilroy D., editor. Cambridge. 175-185.
- Liu, C.L., S. Tangsombatvisit, J.M. Rosenberg, G. Mandelbaum, E.C. Gillespie, O.P. Gozani, A.A. Alizadeh, and P.J. Utz. 2012a. Specific post-translational histone modifications of neutrophil extracellular traps as immunogens and potential targets of lupus autoantibodies. *Arthritis Res Ther.* 14:R25.
- Liu, K., G.D. Victora, T.A. Schwickert, P. Guermonprez, M.M. Meredith, K. Yao, F.F. Chu, G.J. Randolph, A.Y. Rudensky, and M. Nussenzweig. 2009. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science.* 324:392-397.
- Liu, W.M., T.E. Nahar, R.H. Jacobi, K. Gijzen, J. van Beek, E. Hak, M. Jonges, C.J. Boog, B.A. van der Zeijst, and E.C. Soethout. 2012b. Impaired production of TNF-alpha by dendritic cells of older adults leads to a lower CD8+ T cell response against influenza. *Vaccine.* 30:1659-1666.
- Looney, M.R., J.X. Nguyen, Y. Hu, J.A. Van Ziffle, C.A. Lowell, and M.A. Matthay. 2009. Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest.* 119:3450-3461.
- Looney, M.R., E.E. Thornton, D. Sen, W.J. Lamm, R.W. Glenny, and M.F. Krummel. 2011. Stabilized imaging of immune surveillance in the mouse lung. *Nat Methods.* 8:91-96.
- Lu, T., S.D. Kobayashi, M.T. Quinn, and F.R. Deleo. 2012. A NET Outcome. *Front Immunol.* 3:365.
- Lucka, L., M. Fernando, D. Grunow, C. Kannicht, A.K. Horst, P. Nollau, and C. Wagener. 2005. Identification of Lewis x structures of the cell adhesion molecule CEACAM1 from human granulocytes. *Glycobiology.* 15:87-100.
- Ludwig, I.S., T.B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2006. Two way communication between neutrophils and dendritic cells. *Curr Opin Pharmacol.* 6:408-413.
- Lutz, M.B., A. Dohler, and H. Azukizawa. 2010. Revisiting the tolerogenicity of epidermal Langerhans cells. *Immunol Cell Biol.* 88:381-386.
- Maffia, P.C., S.E. Zittermann, M.L. Scimone, N. Tateosian, N. Amiano, D. Guerrieri, V. Lutzky, D. Rosso, H.E. Romeo, V.E. Garcia, A.C. Issekutz, and H.E. Chuluyan. 2007. Neutrophil elastase converts human immature dendritic cells into transforming growth factor-beta1-secreting cells and reduces allostimulatory ability. *Am J Pathol.* 171:928-937.
- Magombedze, G., P.B. Reddy, S. Eda, and V.V. Ganusov. 2013. Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses. *Front Physiol.* 4:206.
- Mahnke, K., S. Ring, T.S. Johnson, S. Schallenberg, K. Schonfeld, V. Storn, T. Bedke, and A.H. Enk. 2007. Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4+CD25+ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation. *Eur J Immunol.* 37:2117-2126.

- Majai, G., P. Gogolak, C. Ambrus, G. Vereb, J. Hodrea, L. Fesus, and E. Rajnavolgyi. 2010. PPARgamma modulated inflammatory response of human dendritic cell subsets to engulfed apoptotic neutrophils. *J Leukoc Biol.* 88:981-991.
- Makni-Maalej, K., T. Boussetta, M. Hurtado-Nedelec, S.A. Belambri, M.A. Gougerot-Pocidalò, and J. El-Benna. 2012. The TLR7/8 agonist CL097 primes N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated NADPH oxidase activation in human neutrophils: critical role of p47phox phosphorylation and the proline isomerase Pin1. *J Immunol.* 189:4657-4665.
- Makni-Maalej, K., M. Chiandotto, M. Hurtado-Nedelec, S. Bedouhene, M.A. Gougerot-Pocidalò, P.M. Dang, and J. El-Benna. 2013. Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochem Pharmacol.* 85:92-100.
- Mankan, A.K., T. Dau, D. Jenne, and V. Hornung. 2012. The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1beta processing in neutrophils. *Eur J Immunol.* 42:710-715.
- Mantegazza, A.R., A. Savina, M. Vermeulen, L. Perez, J. Geffner, O. Hermine, S.D. Rosenzweig, F. Faure, and S. Amigorena. 2008. NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood.* 112:4712-4722.
- Mantovani, A., M.A. Cassatella, C. Costantini, and S. Jaillon. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 11:519-531.
- Manzenreiter, R., F. Kienberger, V. Marcos, K. Schilcher, W.D. Krautgartner, A. Obermayer, M. Huml, W. Stoiber, A. Hector, M. Griese, M. Hannig, M. Studnicka, L. Vitkov, and D. Hartl. 2012. Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy. *J Cyst Fibros.* 11:84-92.
- Marin-Esteban, V., I. Turbica, G. Dufour, N. Semiramoth, A. Gleizes, R. Gorges, I. Beau, A.L. Servin, V. Lievin-Le Moal, C. Sandre, and S. Chollet-Martin. 2012. Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli strain C1845 induces neutrophil extracellular traps that kill bacteria and damage human enterocyte-like cells. *Infect Immun.* 80:1891-1899.
- Martin, C., P.C. Burdon, G. Bridger, J.C. Gutierrez-Ramos, T.J. Williams, and S.M. Rankin. 2003. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity.* 19:583-593.
- Martin, T.A., and W.G. Jiang. 2010. Anti-Cancer agents in medicinal chemistry (Formerly current medicinal chemistry - Anti-cancer agents). *Anticancer Agents Med Chem.* 10:1.
- Mathers, A.R., B.M. Janelsins, J.P. Rubin, O.A. Tkacheva, W.J. Shufesky, S.C. Watkins, A.E. Morelli, and A.T. Larregina. 2009. Differential capability of human cutaneous dendritic cell subsets to initiate Th17 responses. *J Immunol.* 182:921-933.
- Mazzoni, A., and D.M. Segal. 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol.* 75:721-730.

- McCormick, A., L. Heesemann, J. Wagener, V. Marcos, D. Hartl, J. Loeffler, J. Heesemann, and F. Ebel. 2010. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect.* 12:928-936.
- McDonald, B., E.F. McAvoy, F. Lam, V. Gill, C. de la Motte, R.C. Savani, and P. Kubes. 2008. Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. *J Exp Med.* 205:915-927.
- McDonald, B., R. Urrutia, B.G. Yipp, C.N. Jenne, and P. Kubes. 2012. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe.* 12:324-333.
- McGrath, E.E., H.M. Marriott, A. Lawrie, S.E. Francis, I. Sabroe, S.A. Renshaw, D.H. Dockrell, and M.K. Whyte. 2011. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) regulates inflammatory neutrophil apoptosis and enhances resolution of inflammation. *J Leukoc Biol.* 90:855-865.
- Megens, R.T., K. Kemmerich, J. Pyta, C. Weber, and O. Soehnlein. 2011. Intravital imaging of phagocyte recruitment. *Thromb Haemost.* 105:802-810.
- Megens, R.T., S. Vijayan, D. Lievens, Y. Doring, M.A. van Zandvoort, J. Grommes, C. Weber, and O. Soehnlein. 2012. Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 107:597-598.
- Megiovanni, A.M., F. Sanchez, M. Robledo-Sarmiento, C. Morel, J.C. Gluckman, and S. Boudaly. 2006. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 79:977-988.
- Mempel, T.R., S.E. Henrickson, and U.H. Von Andrian. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature.* 427:154-159.
- Menegazzi, R., E. Decleva, and P. Dri. 2012. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood.* 119:1214-1216.
- Menezes, G.B., W.Y. Lee, H. Zhou, C.C. Waterhouse, D.C. Cara, and P. Kubes. 2009. Selective down-regulation of neutrophil Mac-1 in endotoxemic hepatic microcirculation via IL-10. *J Immunol.* 183:7557-7568.
- Meng, W., A. Paunel-Gorgulu, S. Flohe, A. Hoffmann, I. Witte, C. Mackenzie, S.E. Baldus, J. Windolf, and T.T. Logters. 2012. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit Care.* 16:R137.
- Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 31:563-604.
- Messmer, D., H. Yang, G. Telusma, F. Knoll, J. Li, B. Messmer, K.J. Tracey, and N. Chiorazzi. 2004. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol.* 173:307-313.
- Metzler, K.D., T.A. Fuchs, W.M. Nauseef, D. Reumaux, J. Roesler, I. Schulze, V. Wahn, V. Papayannopoulos, and A. Zychlinsky. 2011. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 117:953-959.

- Micheletti, A., C. Costantini, F. Calzetti, D. Camuesco, S. Costa, N. Tamassia, and M.A. Cassatella. 2013. Neutrophils promote 6-sulfo LacNAc<sup>+</sup> dendritic cell (slanDC) survival. *J Leukoc Biol.*
- Mihalache, C.C., and H.U. Simon. 2012. Autophagy regulation in macrophages and neutrophils. *Exp Cell Res.* 318:1187-1192.
- Mitroulis, I., K. Kambas, A. Chrysanthopoulou, P. Skendros, E. Apostolidou, I. Kourtzelis, G.I. Drosos, D.T. Boumpas, and K. Ritis. 2011. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1beta and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One.* 6:e29318.
- Mitroulis, I., I. Kourtzelis, K. Kambas, S. Rafail, A. Chrysanthopoulou, M. Speletas, and K. Ritis. 2010. Regulation of the autophagic machinery in human neutrophils. *Eur J Immunol.* 40:1461-1472.
- Mocsai, A. 2013. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 210:1283-1299.
- Mollinedo, F., J. Calafat, H. Janssen, B. Martin-Martin, J. Canchado, S.M. Nabokina, and C. Gajate. 2006. Combinatorial SNARE complexes modulate the secretion of cytoplasmic granules in human neutrophils. *J Immunol.* 177:2831-2841.
- Monteiro, R.C. 2013. L35. Fc receptors and cell activation. *Presse Med.* 42:598-599.
- Monteleone, I., A.M. Platt, E. Jaensson, W.W. Agace, and A.M. Mowat. 2008. IL-10-dependent partial refractoriness to Toll-like receptor stimulation modulates gut mucosal dendritic cell function. *Eur J Immunol.* 38:1533-1547.
- Moran, E.M., R. Heydrich, C.T. Ng, T.P. Saber, J. McCormick, J. Sieper, H. Appel, U. Fearon, and D.J. Veale. 2011. IL-17A expression is localised to both mononuclear and polymorphonuclear synovial cell infiltrates. *PLoS One.* 6:e24048.
- Morel, C., E. Badell, V. Abadie, M. Robledo, N. Setterblad, J.C. Gluckman, B. Gicquel, S. Boudaly, and N. Winter. 2008. Mycobacterium bovis BCG-infected neutrophils and dendritic cells cooperate to induce specific T cell responses in humans and mice. *Eur J Immunol.* 38:437-447.
- Morgan, D., M. Capasso, B. Musset, V.V. Cherny, E. Rios, M.J. Dyer, and T.E. DeCoursey. 2009. Voltage-gated proton channels maintain pH in human neutrophils during phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:18022-18027.
- Morshed, M., S. Yousefi, C. Stockle, H.U. Simon, and D. Simon. 2012. Thymic stromal lymphopoietin stimulates the formation of eosinophil extracellular traps. *Allergy.* 67:1127-1137.
- Munafò, D.B., J.L. Johnson, A.A. Brzezinska, B.A. Ellis, M.R. Wood, and S.D. Catz. 2009. DNase I inhibits a late phase of reactive oxygen species production in neutrophils. *J Innate Immun.* 1:527-542.
- Murphy, E., K. Shibuya, N. Hosken, P. Openshaw, V. Maino, K. Davis, K. Murphy, and A. O'Garra. 1996. Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *J Exp Med.* 183:901-913.
- Murphy, K., P., a. Traver, and W. M. 2008. Antigen recognition by B-cell and T-cell receptors. In *Janeway's Immunobiology - 7th edition*. G. Science, editor, New York - US. 123-137.

- Naik, S.H., P. Sathe, H.Y. Park, D. Metcalf, A.I. Proietto, A. Dakic, S. Carotta, M. O'Keeffe, M. Bahlo, A. Papenfuss, J.Y. Kwak, L. Wu, and K. Shortman. 2007. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol.* 8:1217-1226.
- Nakazawa, D., U. Tomaru, A. Suzuki, S. Masuda, R. Hasegawa, T. Kobayashi, S. Nishio, M. Kasahara, and A. Ishizu. 2012. Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum.* 64:3779-3787.
- Nam, Y.H., A. Min, S.H. Kim, Y.A. Lee, K.A. Kim, K.J. Song, and M.H. Shin. 2012. Leukotriene B(4) receptors BLT1 and BLT2 are involved in interleukin-8 production in human neutrophils induced by *Trichomonas vaginalis*-derived secretory products. *Inflamm Res.* 61:97-102.
- Narasaraju, T., E. Yang, R.P. Samy, H.H. Ng, W.P. Poh, A.A. Liew, M.C. Phoon, N. van Rooijen, and V.T. Chow. 2011. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am J Pathol.* 179:199-210.
- Narayana Moorthy, A., T. Narasaraju, P. Rai, R. Perumalsamy, K.B. Tan, S. Wang, B. Engelward, and V.T. Chow. 2013. In vivo and in vitro studies on the roles of neutrophil extracellular traps during secondary pneumococcal pneumonia after primary pulmonary influenza infection. *Front Immunol.* 4:56.
- Nauseef, W.M. 2012. Editorial: Nyet to NETs? A pause for healthy skepticism. *J Leukoc Biol.* 91:353-355.
- Neeli, I., N. Dwivedi, S. Khan, and M. Radic. 2009. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun.* 1:194-201.
- Neeli, I., S.N. Khan, and M. Radic. 2008. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol.* 180:1895-1902.
- Neeli, I., and M. Radic. 2013. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front Immunol.* 4:38.
- Ng, H.H., T. Narasaraju, M.C. Phoon, M.K. Sim, J.E. Seet, and V.T. Chow. 2012. Doxycycline treatment attenuates acute lung injury in mice infected with virulent influenza H3N2 virus: involvement of matrix metalloproteinases. *Exp Mol Pathol.* 92:287-295.
- Nordenfelt, P., and H. Tapper. 2010. The role of calcium in neutrophil granule-phagosome fusion. *Commun Integr Biol.* 3:224-226.
- Nordenfelt, P., and H. Tapper. 2011. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol.* 90:271-284.
- O'Connell, R.M., D.S. Rao, and D. Baltimore. 2012. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol.* 30:295-312.
- O'Donoghue, A.J., Y. Jin, G.M. Knudsen, N.C. Perera, D.E. Jenne, J.E. Murphy, C.S. Craik, and T.W. Hermiston. 2013. Global substrate profiling of proteases in human neutrophil extracellular traps reveals consensus motif predominantly contributed by elastase. *PLoS One.* 8:e75141.

- O'Neill, L.A., D. Golenbock, and A.G. Bowie. 2013. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 13:453-460.
- Odobasic, D., A.R. Kitching, Y. Yang, K.M. O'Sullivan, R.C. Muljadi, K.L. Edgton, D.S. Tan, S.A. Summers, E.F. Morand, and S.R. Holdsworth. 2013. Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function. *Blood.* 121:4195-4204.
- Oeckinghaus, A., M.S. Hayden, and S. Ghosh. 2011. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol.* 12:695-708.
- Ortega-Gomez, A., M. Perretti, and O. Soehnlein. 2013. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med.* 5:661-674.
- Oyoshi, M.K., R. He, Y. Li, S. Mondal, J. Yoon, R. Afshar, M. Chen, D.M. Lee, H.R. Luo, A.D. Luster, J.S. Cho, L.S. Miller, A. Larson, G.F. Murphy, and R.S. Geha. 2012. Leukotriene B4-driven neutrophil recruitment to the skin is essential for allergic skin inflammation. *Immunity.* 37:747-758.
- Palic, D., J. Ostojic, C.B. Andreasen, and J.A. Roth. 2007. Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev Comp Immunol.* 31:805-816.
- Palmer, L.J., I.L. Chapple, H.J. Wright, A. Roberts, and P.R. Cooper. 2012a. Extracellular deoxyribonuclease production by periodontal bacteria. *J Periodontal Res.* 47:439-445.
- Palmer, L.J., P.R. Cooper, M.R. Ling, H.J. Wright, A. Huissoon, and I.L. Chapple. 2012b. Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clin Exp Immunol.* 167:261-268.
- Palucka, K., and J. Banchereau. 2013. Human dendritic cell subsets in vaccination. *Curr Opin Immunol.* 25:396-402.
- Panzer, M., S. Sitte, S. Wirth, I. Drexler, T. Sparwasser, and D. Voehringer. 2012. Rapid in vivo conversion of effector T cells into Th2 cells during helminth infection. *J Immunol.* 188:615-623.
- Papayannopoulos, V., K.D. Metzler, A. Hakkim, and A. Zychlinsky. 2010. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 191:677-691.
- Papayannopoulos, V., D. Staab, and A. Zychlinsky. 2011. Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy. *PLoS One.* 6:e28526.
- Park, S.J., M.D. Burdick, W.K. Brix, M.H. Stoler, D.S. Askew, R.M. Strieter, and B. Mehrad. 2010. Neutropenia enhances lung dendritic cell recruitment in response to *Aspergillus* via a cytokine-to-chemokine amplification loop. *J Immunol.* 185:6190-6197.
- Park, S.J., M.D. Burdick, and B. Mehrad. 2012. Neutrophils mediate maturation and efflux of lung dendritic cells in response to *Aspergillus fumigatus* germ tubes. *Infect Immun.* 80:1759-1765.
- Parker, H., A.M. Albrett, A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn. 2012a. Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *J Leukoc Biol.* 91:369-376.

- Parker, H., M. Dragunow, M.B. Hampton, A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn. 2012b. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol.* 92:841-849.
- Parker, H., and C.C. Winterbourn. 2012. Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Front Immunol.* 3:424.
- Patel, S., S. Kumar, A. Jyoti, B.S. Srinag, R.S. Keshari, R. Saluja, A. Verma, K. Mitra, M.K. Barthwal, H. Krishnamurthy, V.K. Bajpai, and M. Dikshit. 2010. Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide.* 22:226-234.
- Pelletier, M., L. Maggi, A. Micheletti, E. Lazzeri, N. Tamassia, C. Costantini, L. Cosmi, C. Lunardi, F. Annunziato, S. Romagnani, and M.A. Cassatella. 2010. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood.* 115:335-343.
- Perretti, M., and F. D'Acquisto. 2009. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 9:62-70.
- Phillipson, M., B. Heit, P. Colarusso, L. Liu, C.M. Ballantyne, and P. Kubes. 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med.* 203:2569-2575.
- Pilsczek, F.H., D. Salina, K.K. Poon, C. Fahey, B.G. Yipp, C.D. Sibley, S.M. Robbins, F.H. Green, M.G. Surette, M. Sugai, M.G. Bowden, M. Hussain, K. Zhang, and P. Kubes. 2010. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 185:7413-7425.
- Pratesi, F., I. Dioni, C. Tommasi, M.C. Alcaro, I. Paolini, F. Barbetti, F. Boscaro, F. Panza, I. Puxeddu, P. Rovero, and P. Migliorini. 2013. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann Rheum Dis.*
- Prince, L.R., M.K. Whyte, I. Sabroe, and L.C. Parker. 2011. The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr Opin Pharmacol.* 11:397-403.
- Procko, E., G. Raghuraman, D.C. Wiley, M. Raghavan, and R. Gaudet. 2005. Identification of domain boundaries within the N-termini of TAP1 and TAP2 and their importance in tapasin binding and tapasin-mediated increase in peptide loading of MHC class I. *Immunol Cell Biol.* 83:475-482.
- Prokopowicz, Z.M., F. Arce, R. Biedron, C.L. Chiang, M. Ciszek, D.R. Katz, M. Nowakowska, S. Zapotoczny, J. Marcinkiewicz, and B.M. Chain. 2010. Hypochlorous acid: a natural adjuvant that facilitates antigen processing, cross-priming, and the induction of adaptive immunity. *J Immunol.* 184:824-835.
- Puga, I., M. Cols, C.M. Barra, B. He, L. Cassis, M. Gentile, L. Comerma, A. Chorny, M. Shan, W. Xu, G. Magri, D.M. Knowles, W. Tam, A. Chiu, J.B. Bussel, S. Serrano, J.A. Lorente, B. Bellosillo, J. Lloreta, N. Juanpere, F. Alameda, T. Baro, C.D. de Heredia, N. Toran, A. Catala, M. Torrebadell, C. Fortuny, V. Cusi, C. Carreras, G.A. Diaz, J.M. Blander, C.M. Farber, G. Silvestri, C. Cunningham-Rundles, M. Calvillo, C. Dufour, L.D. Notarangelo, V. Lougaris, A. Plebani, J.L. Casanova, S.C. Ganai, A. Diefenbach, J.I. Arostegui, M. Juan, J. Yague, N. Mahlaoui, J. Donadieu, K. Chen, and A. Cerutti. 2012. B cell-helper neutrophils stimulate the

- diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol.* 13:170-180.
- Radic, M., and T.N. Marion. 2013. Neutrophil extracellular chromatin traps connect innate immune response to autoimmunity. *Semin Immunopathol.* 35:465-480.
- Ranganathan, P.V., C. Jayakumar, R. Mohamed, Z. Dong, and G. Ramesh. 2013. Netrin-1 regulates the inflammatory response of neutrophils and macrophages, and suppresses ischemic acute kidney injury by inhibiting COX-2-mediated PGE2 production. *Kidney Int.* 83:1087-1098.
- Ratjen, F., K. Paul, S. van Koningsbruggen, S. Breitenstein, E. Rietschel, and W. Nikolaizik. 2005. DNA concentrations in BAL fluid of cystic fibrosis patients with early lung disease: influence of treatment with dornase alpha. *Pediatr Pulmonol.* 39:1-4.
- Reglier, H., M. Arce-Vicioso, M. Fay, M.A. Gougerot-Pocidallo, and S. Chollet-Martin. 1998. Lack of IL-10 and IL-13 production by human polymorphonuclear neutrophils. *Cytokine.* 10:192-198.
- Reizis, B., A. Bunin, H.S. Ghosh, K.L. Lewis, and V. Sisirak. 2011. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol.* 29:163-183.
- Remijsen, Q., T. Vanden Berghe, E. Wirawan, B. Asselbergh, E. Parthoens, R. De Rycke, S. Noppen, M. Delforge, J. Willems, and P. Vandenabeele. 2011. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 21:290-304.
- Ren R, F.Y., Willis MS 2012. The Molecular Pathophysiology, Differential Diagnosis, and Treatment of MPO Deficiency. *In J Clinic Experiment Pathol*
- Ribeiro-Gomes, F.L., N.C. Peters, A. Debrabant, and D.L. Sacks. 2012. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog.* 8:e1002536.
- Rinchai, D., P. Khaenam, C. Kewcharoenwong, S. Buddhisa, R. Pankla, D. Chaussabel, G.J. Bancroft, and G. Lertmemongkolchai. 2012. Production of interleukin-27 by human neutrophils regulates their function during bacterial infection. *Eur J Immunol.* 42:3280-3290.
- Rivas-Fuentes, S., E. Garcia-Garcia, G. Nieto-Castaneda, and C. Rosales. 2010. Fcγ receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils. *Cell Immunol.* 263:114-121.
- Rohrbach, A.S., D.J. Slade, P.R. Thompson, and K.A. Mowen. 2012. Activation of PAD4 in NET formation. *Front Immunol.* 3:360.
- Romani, L., A. Mencacci, E. Cenci, G. Del Sero, F. Bistoni, and P. Puccetti. 1997. An immunoregulatory role for neutrophils in CD4+ T helper subset selection in mice with candidiasis. *J Immunol.* 158:2356-2362.
- Rorvig, S., C. Honore, L.I. Larsson, S. Ohlsson, C.C. Pedersen, L.C. Jacobsen, J.B. Cowland, P. Garred, and N. Borregaard. 2009. Ficolin-1 is present in a highly mobilizable subset of human neutrophil granules and associates with the cell surface after stimulation with fMLP. *J Leukoc Biol.* 86:1439-1449.

- Rorvig, S., O. Ostergaard, N.H. Heegaard, and N. Borregaard. 2013. Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *J Leukoc Biol.*
- Rose, F.R., K. Bailey, J.W. Keyte, W.C. Chan, D. Greenwood, and Y.R. Mahida. 1998. Potential role of epithelial cell-derived histone H1 proteins in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract. *Infect Immun.* 66:3255-3263.
- Rosenberger, P., J.M. Schwab, V. Mirakaj, E. Masekowsky, A. Mager, J.C. Morote-Garcia, K. Unertl, and H.K. Eltzschig. 2009. Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia. *Nat Immunol.* 10:195-202.
- Rovere-Querini, P., A. Capobianco, P. Scaffidi, B. Valentini, F. Catalanotti, M. Giazzon, I.E. Dumitriu, S. Muller, M. Iannacone, C. Traversari, M.E. Bianchi, and A.A. Manfredi. 2004. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep.* 5:825-830.
- Rowe, S.M., S. Miller, and E.J. Sorscher. 2005. Cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 352:1992-2001.
- Saffarzadeh, M., C. Juenemann, M.A. Queisser, G. Lochnit, G. Barreto, S.P. Galuska, J. Lohmeyer, and K.T. Preissner. 2012. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One.* 7:e32366.
- Saffarzadeh, M., and K.T. Preissner. 2013. Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection. *Curr Opin Hematol.* 20:3-9.
- Saitoh, T., J. Komano, Y. Saitoh, T. Misawa, M. Takahama, T. Kozaki, T. Uehata, H. Iwasaki, H. Omori, S. Yamaoka, N. Yamamoto, and S. Akira. 2012. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe.* 12:109-116.
- Salio, M., J.D. Silk, and V. Cerundolo. 2010. Recent advances in processing and presentation of CD1 bound lipid antigens. *Curr Opin Immunol.* 22:81-88.
- Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 179:1109-1118.
- Sallusto, F., B. Palermo, D. Lenig, M. Miettinen, S. Matikainen, I. Julkunen, R. Forster, R. Burgstahler, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol.* 29:1617-1625.
- Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C.R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 28:2760-2769.
- Sangaletti, S., C. Tripodo, C. Chiodoni, C. Guarnotta, B. Cappetti, P. Casalini, S. Piconese, M. Parenza, C. Guiducci, C. Vitali, and M.P. Colombo. 2012. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood.* 120:3007-3018.

- Sareila, O., T. Kelkka, A. Pizzolla, M. Hultqvist, and R. Holmdahl. 2011. NOX2 complex-derived ROS as immune regulators. *Antioxid Redox Signal*. 15:2197-2208.
- Sasai, M., and M. Yamamoto. 2013. Pathogen recognition receptors: ligands and signaling pathways by Toll-like receptors. *Int Rev Immunol*. 32:116-133.
- Sato, K., and S. Fujita. 2007. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int*. 56:183-191.
- Savina, A., A. Peres, I. Cebrian, N. Carmo, C. Moita, N. Hacohen, L.F. Moita, and S. Amigorena. 2009. The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells. *Immunity*. 30:544-555.
- Scapini, P., F. Bazzoni, and M.A. Cassatella. 2008. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunol Lett*. 116:1-6.
- Scapini, P., J.A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni, and M.A. Cassatella. 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev*. 177:195-203.
- Scapini, P., C. Laudanna, C. Pinardi, P. Allavena, A. Mantovani, S. Sozzani, and M.A. Cassatella. 2001. Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur J Immunol*. 31:1981-1988.
- Schakel, K., R. Kannagi, B. Kniep, Y. Goto, C. Mitsuoka, J. Zwirner, A. Soruri, M. von Kietzell, and E. Rieber. 2002. 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity*. 17:289-301.
- Scherz-Shouval, R., E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil, and Z. Elazar. 2007. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J*. 26:1749-1760.
- Schlenner, S.M., V. Madan, K. Busch, A. Tietz, C. Laufle, C. Costa, C. Blum, H.J. Fehling, and H.R. Rodewald. 2010. Fate mapping reveals separate origins of T cells and myeloid lineages in the thymus. *Immunity*. 32:426-436.
- Scholz, C.C., and C.T. Taylor. 2013. Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity. *Curr Opin Pharmacol*. 13:646-653.
- Schorn, C., C. Janko, M. Latzko, R. Chaurio, G. Schett, and M. Herrmann. 2012. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front Immunol*. 3:277.
- Schulz, O., E. Jaensson, E.K. Persson, X. Liu, T. Worbs, W.W. Agace, and O. Pabst. 2009. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med*. 206:3101-3114.
- Schulze, M.S., and K.W. Wucherpfennig. 2012. The mechanism of HLA-DM induced peptide exchange in the MHC class II antigen presentation pathway. *Curr Opin Immunol*. 24:105-111.
- Schuster, S., B. Hurrell, and F. Tacchini-Cottier. 2012. Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. *J Leukoc Biol*.

- Scimone, M.L., V.P. Lutzky, S.I. Zittermann, P. Maffia, C. Jancic, F. Buzzola, A.C. Issekutz, and H.E. Chuluyan. 2005. Migration of polymorphonuclear leucocytes is influenced by dendritic cells. *Immunology*. 114:375-385.
- Segura, E., and S. Amigorena. 2013a. Identification of human inflammatory dendritic cells. *Oncoimmunology*. 2:e23851.
- Segura, E., and S. Amigorena. 2013b. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.*
- Segura, E., J. Valladeau-Guilemond, M.H. Donnadieu, X. Sastre-Garau, V. Soumelis, and S. Amigorena. 2012. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med*. 209:653-660.
- Segura, E., and J.A. Villadangos. 2011. A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells. *Traffic*. 12:1677-1685.
- Seneschal, J., R.A. Clark, A. Gehad, C.M. Baecher-Allan, and T.S. Kupper. 2012. Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity*. 36:873-884.
- Serhan C., and H. J. 2010. Lipid mediators in acute inflammation and resolution: eicosanoids, PAF, resolvins and protectins. *In* Fundamentals of inflammation. W.P. Serhan C., and Gilroy D., editor. Cambridge. 153-174.
- Serhan, C.N., N. Chiang, and T.E. Van Dyke. 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 8:349-361.
- Setterblad, N., V. Blancheteau, A. Delaguillaumie, F. Michel, S. Becart, G. Lombardi, O. Acuto, D. Charron, and N. Mooney. 2004. Cognate MHC-TCR interaction leads to apoptosis of antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol*. 75:1036-1044.
- Sheedy, F.J., E. Palsson-McDermott, E.J. Hennessey, C. Martin, J.J. O'Leary, Q. Ruan, D.S. Johnson, Y. Chen, and L.A. O'Neill. 2010. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol*. 11:141-147.
- Silva, M.T. 2010a. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. *J Leukoc Biol*. 87:805-813.
- Silva, M.T. 2010b. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol*. 87:93-106.
- Simon, D., S. Hoesli, N. Roth, S. Staedler, S. Yousefi, and H.U. Simon. 2011. Eosinophil extracellular DNA traps in skin diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 127:194-199.
- Simon, D., H.U. Simon, and S. Yousefi. 2013. Extracellular DNA traps in allergic, infectious, and autoimmune diseases. *Allergy*. 68:409-416.
- Singer, B.B., E. Klaile, I. Scheffrahn, M.M. Muller, R. Kammerer, W. Reutter, B. Obrink, and L. Lucka. 2005. CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligand-induced apoptosis in granulocytes. *Eur J Immunol*. 35:1949-1959.
- Skrzeczynska-Moncznik, J., A. Wlodarczyk, M. Banas, M. Kwitniewski, K. Zabieglo, M. Kapinska-Mrowiecka, A. Dubin, and J. Cichy. 2013. DNA structures decorated

- with cathepsin G/secretory leukocyte proteinase inhibitor stimulate IFN $\gamma$  production by plasmacytoid dendritic cells. *Am J Clin Exp Immunol.* 2:186-194.
- Skrzeczynska-Moncznik, J., A. Wlodarczyk, K. Zabieglo, M. Kapinska-Mrowiecka, E. Marewicz, A. Dubin, J. Potempa, and J. Cichy. 2012. Secretory leukocyte proteinase inhibitor-competent DNA deposits are potent stimulators of plasmacytoid dendritic cells: implication for psoriasis. *J Immunol.* 189:1611-1617.
- Skubitz, K.M., and R.W. Snook, 2nd. 1987. Monoclonal antibodies that recognize lacto-N-fucopentaose III (CD15) react with the adhesion-promoting glycoprotein family (LFA-1/HMac-1/gp 150,95) and CR1 on human neutrophils. *J Immunol.* 139:1631-1639.
- Soehnlein, O., C. Weber, and L. Lindbom. 2009. Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol.* 30:538-546.
- Spadaro, M., C. Caorsi, P. Ceruti, A. Varadhachary, G. Forni, F. Pericle, and M. Giovarelli. 2008. Lactoferrin, a major defense protein of innate immunity, is a novel maturation factor for human dendritic cells. *FASEB J.* 22:2747-2757.
- Springer, D.J., P. Ren, R. Raina, Y. Dong, M.J. Behr, B.F. McEwen, S.S. Bowser, W.A. Samsonoff, S. Chaturvedi, and V. Chaturvedi. 2010. Extracellular fibrils of pathogenic yeast *Cryptococcus gattii* are important for ecological niche, murine virulence and human neutrophil interactions. *PLoS One.* 5:e10978.
- Stark, M.A., Y. Huo, T.L. Burcin, M.A. Morris, T.S. Olson, and K. Ley. 2005. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity.* 22:285-294.
- Stepensky, P., A. Saada, M. Cowan, A. Tabib, U. Fischer, Y. Berkun, H. Saleh, N. Simanovsky, A. Kogot-Levin, M. Weintraub, H. Ganaiem, A. Shaag, S. Zenvirt, A. Borkhardt, O. Elpeleg, N.J. Bryant, and D. Mevorach. 2013. The Thr224Asn mutation in the VPS45 gene is associated with the congenital neutropenia and primary myelofibrosis of infancy. *Blood.* 121:5078-5087.
- Stoecklin, G., and P. Anderson. 2006. Posttranscriptional mechanisms regulating the inflammatory response. *Adv Immunol.* 89:1-37.
- Stoitzner, P. 2010. The Langerhans cell controversy: are they immunostimulatory or immunoregulatory cells of the skin immune system? *Immunol Cell Biol.* 88:348-350.
- Strobl, H., E. Riedl, C. Scheinecker, C. Bello-Fernandez, W.F. Pickl, K. Rappersberger, O. Majdic, and W. Knapp. 1996. TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. *J Immunol.* 157:1499-1507.
- Sumby, P., K.D. Barbian, D.J. Gardner, A.R. Whitney, D.M. Welty, R.D. Long, J.R. Bailey, M.J. Parnell, N.P. Hoe, G.G. Adams, F.R. Deleo, and J.M. Musser. 2005. Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:1679-1684.
- Summers, C., S.M. Rankin, A.M. Condliffe, N. Singh, A.M. Peters, and E.R. Chilvers. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 31:318-324.
- Svensson, M., B. Johansson-Lindbom, F. Zapata, E. Jaensson, L.M. Austenaa, R. Blomhoff, and W.W. Agace. 2008. Retinoic acid receptor signaling levels and

- antigen dose regulate gut homing receptor expression on CD8+ T cells. *Mucosal Immunol.* 1:38-48.
- Taflin, C., D. Charron, D. Glotz, and N. Mooney. 2012. Regulation of the CD4+ T cell allo-immune response by endothelial cells. *Hum Immunol.* 73:1269-1274.
- Taganov, K.D., M.P. Boldin, K.J. Chang, and D. Baltimore. 2006. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:12481-12486.
- Tager, A.M., and A.D. Luster. 2003. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 69:123-134.
- Taieb, J., C. Delarche, V. Paradis, P. Mathurin, A. Grenier, B. Crestani, M. Dehoux, D. Thabut, M.A. Gougerot-Pocidallo, T. Poynard, and S. Chollet-Martin. 2002. Polymorphonuclear neutrophils are a source of hepatocyte growth factor in patients with severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol.* 36:342-348.
- Takei, H., A. Araki, H. Watanabe, A. Ichinose, and F. Sendo. 1996. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol.* 59:229-240.
- Tamassia, N., M. Zimmermann, M. Castellucci, R. Ostuni, K. Bruderek, B. Schilling, S. Brandau, F. Bazzoni, G. Natoli, and M.A. Cassatella. 2013. Cutting edge: An inactive chromatin configuration at the IL-10 locus in human neutrophils. *J Immunol.* 190:1921-1925.
- Tanaka, Y., Y. Nagai, T. Kuroishi, Y. Endo, and S. Sugawara. 2012. Stimulation of Ly-6G on neutrophils in LPS-primed mice induces platelet-activating factor (PAF)-mediated anaphylaxis-like shock. *J Leukoc Biol.* 91:485-494.
- Tateda, K., T.A. Moore, J.C. Deng, M.W. Newstead, X. Zeng, A. Matsukawa, M.S. Swanson, K. Yamaguchi, and T.J. Standiford. 2001. Early recruitment of neutrophils determines subsequent T1/T2 host responses in a murine model of *Legionella pneumophila* pneumonia. *J Immunol.* 166:3355-3361.
- Tateosian, N.L., R.M. Reiteri, N.O. Amiano, M.J. Costa, X. Villalonga, D. Guerrieri, and P.C. Maffia. 2011. Neutrophil elastase treated dendritic cells promote the generation of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T cells in vitro. *Cell Immunol.* 269:128-134.
- te Velde, A.A., Y. van Kooyk, H. Braat, D.W. Hommes, T.A. DelleMijn, J.F. Slors, S.J. van Deventer, and F.A. Vyth-Dreese. 2003. Increased expression of DC-SIGN+IL-12+IL-18+ and CD83+IL-12-IL-18- dendritic cell populations in the colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Eur J Immunol.* 33:143-151.
- Tecchio, C., P. Scapini, G. Pizzolo, and M.A. Cassatella. 2013. On the cytokines produced by human neutrophils in tumors. *Semin Cancer Biol.* 23:159-170.
- Tel, J., A.M. van der Leun, C.G. Figdor, R. Torensma, and I.J. de Vries. 2012. Harnessing human plasmacytoid dendritic cells as professional APCs. *Cancer Immunol Immunother.* 61:1279-1288.
- Thomas, C.J., and K. Schroder. 2013. Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol.* 34:317-328.

- Thomas, G.M., C. Carbo, B.R. Curtis, K. Martinod, I.B. Mazo, D. Schatzberg, S.M. Cifuni, T.A. Fuchs, U.H. von Andrian, J.H. Hartwig, R.H. Aster, and D.D. Wagner. 2012. Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood*. 119:6335-6343.
- Throm, S.L., and M.J. Klemsz. 2003. PU.1 regulates glutathione peroxidase expression in neutrophils. *J Leukoc Biol*. 74:111-117.
- Tili, E., J.J. Michaille, A. Cimino, S. Costinean, C.D. Dumitru, B. Adair, M. Fabbri, H. Alder, C.G. Liu, G.A. Calin, and C.M. Croce. 2007. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol*. 179:5082-5089.
- Tillack, K., P. Breiden, R. Martin, and M. Sospedra. 2012. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J Immunol*. 188:3150-3159.
- Tohyama, Y., and H. Yamamura. 2006. Complement-mediated phagocytosis--the role of Syk. *IUBMB Life*. 58:304-308.
- Tosello Boari, J., M.C. Amezcua Vesely, D.A. Bermejo, M.C. Ramello, C.L. Montes, H. Cejas, A. Gruppi, and E.V. Acosta Rodriguez. 2012. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PLoS Pathog*. 8:e1002658.
- Troutman, T.D., J.F. Bazan, and C. Pasare. 2012a. Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. *Cell Cycle*. 11:3559-3567.
- Troutman, T.D., W. Hu, S. Fulenchek, T. Yamazaki, T. Kurosaki, J.F. Bazan, and C. Pasare. 2012b. Role for B-cell adapter for PI3K (BCAP) as a signaling adapter linking Toll-like receptors (TLRs) to serine/threonine kinases PI3K/Akt. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:273-278.
- Tsuda, M., M. Inaba, Y. Sakaguchi, J. Fukui, Y. Ueda, M. Omae, Y. Ando, H. Mukaide, K. Guo, T. Yabuki, T. Nakatani, and S. Ikehara. 2007. Activation of granulocytes by direct interaction with dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. 150:322-331.
- Tsuda, Y., H. Takahashi, M. Kobayashi, T. Hanafusa, D.N. Herndon, and F. Suzuki. 2004. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity*. 21:215-226.
- Turner, M.L., F.M. Schnorfeil, and T. Brouck. 2011. MicroRNAs regulate dendritic cell differentiation and function. *J Immunol*. 187:3911-3917.
- Underhill, D.M., and A. Ozinsky. 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*. 20:825-852.
- Urban, C.F., D. Ermert, M. Schmid, U. Abu-Abed, C. Goosmann, W. Nacken, V. Brinkmann, P.R. Jungblut, and A. Zychlinsky. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 5:e1000639.

- Urban, C.F., U. Reichard, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 8:668-676.
- Uriarte, S.M., M.J. Rane, G.C. Luerman, M.T. Barati, R.A. Ward, W.M. Nauseef, and K.R. McLeish. 2011. Granule exocytosis contributes to priming and activation of the human neutrophil respiratory burst. *J Immunol.* 187:391-400.
- Vago, J.P., C.R. Nogueira, L.P. Tavares, F.M. Soriani, F. Lopes, R.C. Russo, V. Pinho, M.M. Teixeira, and L.P. Sousa. 2012. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *J Leukoc Biol.* 92:249-258.
- van de Laar, L., P.J. Coffey, and A.M. Woltman. 2012. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood.* 119:3383-3393.
- van de Ven, R., M.F. van den Hout, J.J. Lindenberg, B.J. Sluiter, P.A. van Leeuwen, S.M. Loughheed, S. Meijer, M.P. van den Tol, R.J. Scheper, and T.D. de Gruijl. 2011. Characterization of four conventional dendritic cell subsets in human skin-draining lymph nodes in relation to T-cell activation. *Blood.* 118:2502-2510.
- van Gisbergen, K.P., T.B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2005a. Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol.* 26:626-631.
- van Gisbergen, K.P., I.S. Ludwig, T.B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2005b. Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett.* 579:6159-6168.
- van Gisbergen, K.P., M. Sanchez-Hernandez, T.B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2005c. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med.* 201:1281-1292.
- van Montfoort, M.L., F. Stephan, M.N. Lauw, B.A. Hutten, G.J. Van Mierlo, S. Solati, S. Middeldorp, J.C. Meijers, and S. Zeerleder. 2013. Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33:147-151.
- Veldhoen, M., C. Uytendhoeve, J. van Snick, H. Helmbj, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm, and B. Stockinger. 2008. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol.* 9:1341-1346.
- Villadangos, J.A., and K. Shortman. 2010. Found in translation: the human equivalent of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med.* 207:1131-1134.
- Villanueva, E., S. Yalavarthi, C.C. Berthier, J.B. Hodgins, R. Khandpur, A.M. Lin, C.J. Rubin, W. Zhao, S.H. Olsen, M. Klinker, D. Shealy, M.F. Denny, J. Plumas, L. Chaperot, M. Kretzler, A.T. Bruce, and M.J. Kaplan. 2011. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 187:538-552.
- Vitkov, L., M. Klappacher, M. Hannig, and W.D. Krautgartner. 2009. Extracellular neutrophil traps in periodontitis. *J Periodontal Res.* 44:664-672.

- von Kockritz-Blickwede, M., O. Goldmann, P. Thulin, K. Heinemann, A. Norrby-Teglund, M. Rohde, and E. Medina. 2008. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*. 111:3070-3080.
- Wang, D., and R.N. Dubois. 2010. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene*. 29:781-788.
- Wang, J., I. Shiratori, J. Uehori, M. Ikawa, and H. Arase. 2013. Neutrophil infiltration during inflammation is regulated by PILRalpha via modulation of integrin activation. *Nat Immunol*. 14:34-40.
- Wang, Y., Y. Chen, L. Xin, S.M. Beverley, E.D. Carlsen, V. Popov, K.P. Chang, M. Wang, and L. Soong. 2011. Differential microbicidal effects of human histone proteins H2A and H2B on *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Infect Immun*. 79:1124-1133.
- Wang, Y., M. Li, S. Stadler, S. Correll, P. Li, D. Wang, R. Hayama, L. Leonelli, H. Han, S.A. Grigoryev, C.D. Allis, and S.A. Coonrod. 2009. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*. 184:205-213.
- Ward, K.A., L.A. Stewart, and A.P. Schwarer. 2006. CD34+-derived CD11c+ + + BDCA-1+ + CD123+ + DC: expansion of a phenotypically undescribed myeloid DC1 population for use in adoptive immunotherapy. *Cytotherapy*. 8:130-140.
- Wardini, A.B., A.B. Guimaraes-Costa, M.T. Nascimento, N.R. Nadaes, M.G. Danelli, C. Mazur, C.F. Benjamim, E.M. Saraiva, and L.H. Pinto-da-Silva. 2010. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. *J Gen Virol*. 91:259-264.
- Wartha, F., K. Beiter, B. Albiger, J. Fernebro, A. Zychlinsky, S. Normark, and B. Henriques-Normark. 2007. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol*. 9:1162-1171.
- Waters, J.P., J.S. Pober, and J.R. Bradley. 2013. Tumour necrosis factor in infectious disease. *J Pathol*. 230:132-147.
- Webster, S.J., M. Daigneault, M.A. Bewley, J.A. Preston, H.M. Marriott, S.R. Walmsley, R.C. Read, M.K. Whyte, and D.H. Dockrell. 2010. Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. *J Immunol*. 185:2968-2979.
- Weinrauch, Y., D. Drujan, S.D. Shapiro, J. Weiss, and A. Zychlinsky. 2002. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature*. 417:91-94.
- Wen, F., G.J. White, H.D. VanEtten, Z. Xiong, and M.C. Hawes. 2009. Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. *Plant Physiol*. 151:820-829.
- Willis, V.C., A.M. Gizinski, N.K. Banda, C.P. Causey, B. Knuckley, K.N. Cordova, Y. Luo, B. Levitt, M. Glogowska, P. Chandra, L. Kulik, W.H. Robinson, W.P. Arend, P.R. Thompson, and V.M. Holers. 2011. N-alpha-benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis. *J Immunol*. 186:4396-4404.

- Winterbourn, C.C., M.B. Hampton, J.H. Livesey, and A.J. Kettle. 2006. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *J Biol Chem.* 281:39860-39869.
- Witko-Sarsat, V. 2013. L34. Neutrophils in ANCA-associated vasculitis: still under investigation. *Presse Med.* 42:595-597.
- Witko-Sarsat, V., J. Mocek, D. Bouayad, N. Tamassia, J.A. Ribeil, C. Candalh, N. Davezac, N. Reuter, L. Mouthon, O. Hermine, M. Pederzoli-Ribeil, and M.A. Cassatella. 2010. Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *J Exp Med.* 207:2631-2645.
- Wittamer, V., B. Bondue, A. Guillabert, G. Vassart, M. Parmentier, and D. Communi. 2005. Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity. *J Immunol.* 175:487-493.
- Wong, K.W., and W.R. Jacobs, Jr. 2013. Mycobacterium tuberculosis exploits human interferon-gamma to stimulate macrophage extracellular trap formation and necrosis. *J Infect Dis.*
- Woodfin, A., M.B. Voisin, M. Beyrau, B. Colom, D. Caille, F.M. Diapouli, G.B. Nash, T. Chavakis, S.M. Albelda, G.E. Rainger, P. Meda, B.A. Imhof, and S. Nourshargh. 2011. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol.* 12:761-769.
- Yan, S.R., K. Sapru, and A.C. Issekutz. 2004. The CD11/CD18 (beta2) integrins modulate neutrophil caspase activation and survival following TNF-alpha or endotoxin induced transendothelial migration. *Immunol Cell Biol.* 82:435-446.
- Yang, C.W., and E.R. Unanue. 2013. Neutrophils control the magnitude and spread of the immune response in a thromboxane A2-mediated process. *J Exp Med.* 210:375-387.
- Yang, D., Q. Chen, O. Chertov, and J.J. Oppenheim. 2000a. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 68:9-14.
- Yang, D., Q. Chen, A.P. Schmidt, G.M. Anderson, J.M. Wang, J. Wooters, J.J. Oppenheim, and O. Chertov. 2000b. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med.* 192:1069-1074.
- Yang, D., Q. Chen, H. Yang, K.J. Tracey, M. Bustin, and J.J. Oppenheim. 2007. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol.* 81:59-66.
- Yang, D., G. de la Rosa, P. Tewary, and J.J. Oppenheim. 2009. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol.* 30:531-537.
- Yang, D., and J.J. Oppenheim. 2009. Alarmins and antimicrobial immunity. *Med Mycol.* 47 Suppl 1:S146-153.
- Yang, D., F. Wei, P. Tewary, O.M. Howard, and J.J. Oppenheim. 2013. Alarmin-induced cell migration. *Eur J Immunol.* 43:1412-1418.
- Yang, Z., and D.J. Klionsky. 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol.* 12:814-822.

- Yipp, B.G., B. Petri, D. Salina, C.N. Jenne, B.N. Scott, L.D. Zbytnuik, K. Pittman, M. Asaduzzaman, K. Wu, H.C. Meijndert, S.E. Malawista, A. de Boisleury Chevance, K. Zhang, J. Conly, and P. Kubes. 2012. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med.* 18:1386-1393.
- Yousefi, S., J.A. Gold, N. Andina, J.J. Lee, A.M. Kelly, E. Kozlowski, I. Schmid, A. Straumann, J. Reichenbach, G.J. Gleich, and H.U. Simon. 2008. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med.* 14:949-953.
- Yousefi, S., C. Mihalache, E. Kozlowski, I. Schmid, and H.U. Simon. 2009. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 16:1438-1444.
- Yousefi, S., D. Simon, and H.U. Simon. 2012. Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease. *Curr Opin Immunol.* 24:736-739.
- Zarbock, A., K. Ley, R.P. McEver, and A. Hidalgo. 2011. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood.* 118:6743-6751.
- Zemans, R.L., N. Briones, M. Campbell, J. McClendon, S.K. Young, T. Suzuki, I.V. Yang, S. De Langhe, S.D. Reynolds, R.J. Mason, M. Kahn, P.M. Henson, S.P. Colgan, and G.P. Downey. 2011. Neutrophil transmigration triggers repair of the lung epithelium via beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:15990-15995.
- Zhang, X., L. Majlessi, E. Deriaud, C. Leclerc, and R. Lo-Man. 2009. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity.* 31:761-771.
- Zhou, X., Q. Dai, and X. Huang. 2012. Neutrophils in acute lung injury. *Front Biosci (Landmark Ed).* 17:2278-2283.
- Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D.N. Hart, P.J. Leenen, Y.J. Liu, G. MacPherson, G.J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J.M. Austyn, and M.B. Lutz. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 116:e74-80.
- Zimmer, A., J. Bouley, M. Le Mignon, E. Pliquet, S. Horiot, M. Turfkruyer, V. Baron-Bodo, F. Horak, E. Nony, A. Louise, H. Moussu, L. Mascarell, and P. Moingeon. 2012. A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 129:1020-1030.
- Zimmer, A., S. Luce, F. Gaignier, E. Nony, M. Naveau, A. Biola-Vidamment, M. Pallardy, L. Van Overtvelt, L. Mascarell, and P. Moingeon. 2011. Identification of a new phenotype of tolerogenic human dendritic cells induced by fungal proteases from *Aspergillus oryzae*. *J Immunol.* 186:3966-3976.



# *Annexes*



## **Structure and functions of Neutrophil Extracellular Traps**

Viviana Marin-Esteban, Lorena Barrientos and Sylvie Chollet-Martin

INSERM UMRS-996 and Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud. Paris, France

**Article de révision invité pour « Enciclopedia of Inflammatory Diseases », Editée par Michael J. Parnham. 2013. Springer.**

**Article accepté**



## Structure and functions of Neutrophil Extracellular Traps

Viviana Marin-Esteban, Lorena Barrientos and Sylvie Chollet-Martin

INSERM UMRS-996 and Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud. Paris, France

### Synonyms

NETs

Netosis

### Definition

In response to various dangers, cells respond by releasing soluble mediators that initiate the inflammatory response. Neutrophils represent the first wave of immune cells which are abundantly recruited to the site of inflammation with the objective of eliminating the danger. In particular, neutrophils are crucial for the efficient elimination of microbes through mechanisms involving either intra-cellular and / or extracellular killing. In both cases, microbes are killed by the combined action of different anti-microbial molecules stored in the cytoplasmic granules or generated *de novo*.

Among the extracellular killing mechanisms, the release of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) is of main importance. NETs were originally described in 2004 (Brinkmann et al. 2004) and correspond to tangled webs of neutrophil ADN harboring a large diversity of proteins expelled out of the cell (figure 1). NETs fulfill important antimicrobial functions but they are also involved in several inflammatory and autoimmune diseases.

NET release by activated leukocytes is a conserved innate antimicrobial strategy, described in fish, chicken and different mammals including mouse and human (Guimaraes-Costa et al. 2012). The release of extracellular DNA structures decorated with proteins from the different cell compartments is not restricted to neutrophils. This phenomenon has also been documented in eosinophils, basophils, monocytes and mast cells (Schorn et al. 2012).

## Structure and Functions

### 1. Formation of NETs.

A large diversity of stimuli prompts neutrophil activation leading to NET release. The formation of NETs in response to pathogens and their microbicidal effect are probably the main physiological functions of NETs and will be discussed below. During inflammation, NET release can be induced by pro-inflammatory mediators, such as  $\text{TNF}\alpha$ , IL-8, platelet activating factor, the combination of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) / complement factor 5a (C5a) or GM-CSF / LPS. Moreover, NET release can also be triggered by activated platelets or endothelial cells, by circulating or extravascular antibodies and immune complexes during autoimmune diseases, by amyloid fibrils and by monosodium urate crystals from synovial fluid of patients with gout (Azevedo et al. 2012; Chen et al. 2012; Schorn et al. 2012). Importantly, NETs can be efficiently generated *in vitro* by pharmacologic agents. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), a prominent activator of protein kinase C, is the most extensively studied stimulus to induce NET release by human neutrophils; interestingly, the response of murine neutrophils to PMA is accompanied by a scanty and delayed release of NETs. Ionomycin, calcium ionophore A23187, ROS and reactive nitrogen species donors also lead to NET release (Fuchs et al. 2007; Kaplan and Radic 2012; Patel et al. 2010).

To date, three different cell mechanisms have been identified giving origin to NETs (figure 2).

In the first mechanism, NETs are formed as the end product of a distinct cell death program called netosis, activated upon neutrophil stimulation by PMA. During netosis, chromatin, the supporting structure of these NETs, gets unwound while nuclear envelope disintegrates allowing the mixing of chromatin with granular and cytoplasmic proteins. Later on, 3 hours after neutrophil activation, the integrity of extracellular membrane is lost and the chromatin, harboring a large diversity of neutrophil proteins, is released into the extracellular medium giving origin to the NETs (Fuchs et al. 2007). Different cellular processes and molecular mechanisms participate in the netosis process. The neutrophils NADPH-oxidase (NOX2), which generates large amounts of reactive oxygen species (ROS), is necessary for netosis. Consistently, netosis is inhibited in the presence of pharmacologic ROS scavengers and is absent in patients with chronic granulomatous disease (CGD) with a genetic deficiency of NOX2. A second mandatory enzyme in netosis is the peptidylarginine deiminase 4 (PAD4),

activated during the inflammatory response and catalyzing the citrullination of arginine residues. As a result, the density on positively charged amino acid residues is reduced, weakening the histone-DNA electrostatic interactions. This is a crucial event for chromatin decondensation during netosis. Other molecules involved in the netosis cascade include the Raf–MEK–ERK kinase pathway and the Rac2, a GTPase associated to NOX2. Elastase and myeloperoxidase (MPO) need to translocate to the nucleus where they participate in histone proteolysis and chromatin decondensation (Brinkmann and Zychlinsky 2012). In addition, an extensive formation of double-membrane vacuoles is observed in the cytoplasm of PMA-activated neutrophils. During the first minutes, these vesicles have the characteristics of autophagic vesicles, engulfing granules and ribosomes that are eventually degraded (Remijnsen et al. 2011). At later times, a different type of double-membrane vesicles appears that are not typical autophagic and might be remnants of the nuclear envelope (Fuchs et al. 2007). In fact, autophagy is activated along netosis and its blockade, by pharmacological inhibitors, redirects neutrophil death towards apoptosis (Remijnsen et al. 2011).

In the second mechanism identified as giving origin to NETs, neutrophils primed with GM-CSF and subsequently activated with LPS or C5a release mitochondrial DNA decorated with granule-derived proteins (figure 2b). This process is rapid, with efficient mitochondrial release at 15 minutes, depending on ROS production. However, it is not directly accompanied by neutrophil cell death; rather, neutrophils show an increased survival due to the activation stimulus (Remijnsen et al. 2011).

The third mechanism at the origin of NETs encompasses the rapid release of nuclear DNA and maintains functional enucleated neutrophils able to accomplish phagocytosis and classic bacterial killing (figure 2c). This process was originally characterized *in vitro* upon neutrophil coculture with the gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and was recently proved *in vivo* in models of systemic or skin bacterial infections (McDonald et al. 2012; Pilsczek et al. 2010; Yipp et al. 2012). Along this process, short stretches of nuclear DNA can be rapidly exported to the extracellular medium in vesicles formed from the outer nuclear membrane. Concomitantly, the whole chromatin is decondensed and the nucleus loses its morphology, expands and can be released out of the cell forming the NETs. This process is not dependent on ROS and occurs through a very rapid mechanism with DNA-loaded vesicles detected at 5 minutes after bacterial contact *in vitro* (Pilsczek et al. 2010). *In vivo*, accumulation of extracellular chromatin is detectable by intra-vital microscopy at 20 minutes after infection

(Yipp et al. 2012). The signaling pathways controlling the release of mitochondrial DNA and the release of nuclei, leaving enucleated neutrophils, are completely uncharacterized. It is important to stress that ROS, elastase and myeloperoxidase are not required in different *in vivo* and *in vitro* models of NET release (Kaplan and Radic 2012; Yipp et al. 2012). For all these processes, further explorations are required to clearly dissect the mechanisms leading to the release of NETs.

### 1. Structure of NETs.

The best characterized NETs are those produced during netosis, upon neutrophil activation with PMA. The central structure of NETs is the chromatin, i.e. DNA wrapped around histones. The smaller NET filaments have a diameter of 15 to 17 nm, probably corresponding to modified nucleosomes, whose reference diameter is 10 nm. Along these filaments, multiple globular domains of around 50 nm diameter are present, where granule-derived and cytoplasmic-derived proteins concentrate. Other regions of NETs, with different diameters, can be identified according to the level of chromatin decondensation. *In vitro*, NETs occupy a volume 10 to 15 times larger than the volume of the initial neutrophil (Brinkmann et al. 2004; Brinkmann and Zychlinsky 2012; Urban et al. 2009). This might also be the case of NETs produced *in vivo* in not confined spaces like blood, lung or peritoneum.

At least 30 different proteins have been identified associated to NETs. The core histones H2A, H2B, H3 and H4 are the most abundant proteins and account for 70% of the total proteins (Urban et al. 2009). Along netosis, histones undergo posttranscriptional modifications, such as proteolysis and citrullination, which translate into an apparent weight decrease of 2 to 5 kDa (Urban et al. 2009). Apart histones, NETs comprise other nuclear proteins as well as proteins from granules, cytoplasm (Urban et al. 2009) and membrane proteins such as NOX2 and CD11b (Marin-Esteban et al. 2012; Munafo et al. 2009). Most of the granule proteins associated with NETs come from azurophilic granules: elastase, the most abundant granular protein corresponding to around 5% of the total NET proteins, cathepsin G, proteinase-3, defensins, myeloperoxidase, azurocidin and lysozyme (Urban et al. 2009). Calprotectin, or S100-calcium binding protein, is the most abundant cytoplasmic protein detected in NETs, also corresponding to around 5% of the total NET proteins. Proteins from cytoskeleton and from different cell organelles also relate to NETs and represent a small

fraction of the total proteins. Some of the proteins associated to NETs, including histones, are highly charged cationic proteins that can tightly interact with DNA (Fuchs et al. 2007).

Protein composition of NETs can be modified according to the activation or the priming state of the cells. For instance, human neutrophils primed with rhIFN $\alpha$  or with IFN $\alpha$ -rich serum from patients before PMA *in vitro* stimulation, generate NETs carrying a significantly larger amount of LL37 and HMGB1, as compared with non primed neutrophils (Garcia-Romo et al. 2011).

## 2. Main role of NETs : response to infection

NETs are formed in response to infection and to other inflammatory conditions. The main physiologic role attributed to NETs is to contribute to host defense. *In vitro*, bacteria, fungi and protozoa parasites can induce the release of NETs. The net-like structure of NETs enables them to snare microbes. As a consequence, microbes get in tight contact with the various enzymes, microbicidal peptides, histones and other molecules immobilized in NETs.

The participation of NETs in controlling infections relays on three strategies (Brinkmann and Zychlinsky, 2012). First, trapping microbes limits their dissemination. The *in vivo* relevance of this effect has been demonstrated in mouse models of *Escherichia coli* sepsis (McDonald et al. 2012) and polymicrobial sepsis (Meng et al. 2012). In these models, NETs are generated by activated neutrophils that adhere to the vascular endothelium while interacting with platelets (McDonald et al. 2012). Dismantling NETs, by treatment with deoxyribonucleases (DNases), leads to increased bacterial spreading to different organs. NETs might be important in limiting *Streptococcus pneumoniae*, Group A *Streptococci* (GAS) and *Mycobacterium tuberculosis* spreading, as NETs have no direct microbicidal effect on these pathogens (Papayannopoulos and Zychlinsky 2009). Second, NETs weaken virulence of microbes by degrading toxins and virulence factors. *Shigella flexneri* and *Staphylococcus aureus* entangled into NETs lose part of their virulence factors: the invasion plasmid antigen (IpaB) and the  $\alpha$ -toxin, respectively, can be degraded by elastase or by other proteases associated to NETs (Brinkmann et al. 2004). Finally, microbicidal proteins associated with NETs display an enhanced and synergic effect, leading to a more efficient microbe killing by mechanisms involving disruption of cell walls and membranes by cationic proteins and peptides, growth inhibition by chelating iron and zinc ions, cytotoxic effect by histones and the generation of

ROS. This synergic effect is proved by the significant reduction of NET microbicidal effect after DNase treatment.

Amongst other bacteria, NETs display a bactericidal action against *S. aureus*, gram-negative bacteria, by a mechanism dependent on the peroxidase activity of MPO. Gram-positive bacteria, including *Escherichia coli*, *S. flexneri* and *Salmonella typhimurium* can also be killed by NETs (Brinkmann et al. 2004; Brinkmann and Zychlinsky 2012). Different fungi induce NET formation: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidalus*, *Candida albicans* and the yeast *C. gattii*. The antifungal activity of NETs has been attributed to calprotectins, which chelate zinc and, less efficiently, manganese ions necessary for fungi survival. A gene therapy addressed to recover NOX2 activity in a child with a CGD allowed to recover the capacity of his neutrophils to form NETs and, concomitantly, the capacity to eradicate an extensive aspergillosis by *A. nidalus* he was suffering from. This result points to the prominent role of neutrophils on antifungal defense and the contribution of NETs as part of the engaged mechanisms to fulfill this function (Brinkmann and Zychlinsky 2012). NETs also participate in anti-viral defense. They accumulate in lungs of mice infected by influenza A virus, though their presence is not necessary for virus clearance (Guimaraes-Costa et al. 2012). Conversely, neutrophils recognize Human Immunodeficiency Virus (HIV) through Toll-like Receptor 7 (TLR-7) and TLR-8 and respond by producing ROS and releasing NET. These NETs exhibit an anti-HIV activity dependent on MPO and  $\alpha$ -defensins (Saitoh et al. 2012). Lastly, NETs are also formed during protozoan infections. They are observed in blood of *Plasmodium falciparum*-infected patients, snaring free trophozoites and infected red blood cells. NETs are also present in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. Whether NETs have an anti-protozoan activity remains to be clearly established as contradictory results exist concerning a potential cytotoxic effect of histones against amastigotes of different *Leishmania* species (Guimaraes-Costa et al. 2012).

The identification of various pathogen strategies to evade NETs witnesses a long co-existence of neutrophils and pathogens during evolution. Extracellular DNases and other extracellular nucleases constitute virulent factors for *Staphylococcus*, *S. pneumoniae* and GAS and they can disassemble the DNA backbone of NETs. In addition, certain serotypes of *S. pneumoniae* reduce NET interaction by forming a capsule and elude the action of cationic bactericidal components of NETs by electrostatic repulsion as a result of introducing positively charged groups on the membrane-associated lipoteichoic acid. *Haemophilus influenzae* forms biofilms

that incorporate structural elements of NETs, thereby eluding NET action and phagocytosis by neutrophils (Brinkmann and Zychlinsky 2012; Guimaraes-Costa et al. 2012; Kaplan and Radic 2012). Pathogens can also promote a cytokine environment opposed to NET formation, as has been described for HIV that activates IL-10 production by dendritic cells dampening neutrophil activation (Saitoh et al. 2012).

## **Pathological Relevance**

### **1. Tissue cytotoxicity and pro-thrombotic activity.**

The structure of NETs restrains the diffusion of neutrophil-derived mediators, limiting the extension of bystander lesions. However, the high local concentration of cytotoxic molecules increases the magnitude of local lesions. This harmful local effect has been particularly proved in an *in vivo* sepsis model, where integrity of NETs in the liver vasculature correlated with hepatocellular damage, tissue necrosis and sinusoidal congestion (McDonald et al. 2012). Tissue injury and deficient oxygenation have been associated to NET accumulation in other inflammatory pathologies such as liver injury, preeclampsia and different neutrophilic lung inflammatory conditions, including transfusion-related acute lung injury, cystic fibrosis and allergic asthma (Brinkmann and Zychlinsky 2012; Kaplan and Radic 2012; Saffarzadeh and Preissner 2012). Two major deleterious effects of NETs are at the origin of these lesions: cytotoxicity and a pro-thrombotic activity.

Cytotoxicity of NETs against endothelial and epithelial cell is mainly mediated by histones and elastase (Brinkmann and Zychlinsky 2012; Marin-Esteban et al. 2012; Saffarzadeh and Preissner 2012). The pro-thrombotic activity of NETs relies on multiple factors. Thrombi are formed by cross-linked fibrin polymers trapping activated platelets and red blood cells. These fibrin polymers can be formed by two different coagulation pathways; one activated by foreign solid bodies in the blood, the other activated by proteases released by the injured endothelium. NETs activate both coagulation pathways (Brinkmann and Zychlinsky 2012; Saffarzadeh and Preissner 2012). On one hand, NETs provide a foreign surface that triggers the contact activation pathway. On the other hand, endothelium injured by NETs releases the tissue factor that activates the extrinsic coagulation pathway. Elastase and cathepsin-G present in NETs boost this latter pathway by degrading some of the endogenous inhibitors. In

consequence, NETs have a significant prothrombotic potential that has been evidenced in different *in vivo* models of thrombosis, deep vein thrombosis and infection-related abdominal aneurysms (Brinkmann and Zychlinsky 2012; Saffarzadeh and Preissner 2012).

The release of NETs is acknowledged as a physiological part of the neutrophil response during inflammation. Correspondingly, regulatory mechanisms exist to dismantle NETs and to regulate their production to counterbalance the extent of the inflammatory response. NETs are mainly dismantled by DNases constantly present in plasma and NETs production can be downregulated by anti-inflammatory cytokines such as IL-10 (Brinkmann and Zychlinsky 2012; Saitoh et al. 2012).

## 2. Autoimmunity.

The identification of NETs as a normal response to infection, exposing a large variety of neutrophil proteins to the extracellular space, was early identified as a risky maneuver with possible consequences in braking of tolerance towards self-antigens (Brinkmann et al. 2004). Auto-antibodies against NET components have already been implicated in several autoimmune diseases.

NETs have been implicated in the physiopathology of small-vessel vasculitis (SVV) positive for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). ANCA-SVV is characterized by the presence of autoantibodies, mostly directed against proteinase-3 or MPO, molecules stocked in neutrophil granules but also associated with NETs and with the cell surface on primed neutrophils. ANCA isolated from patients' sera are able to induce NET release by primed neutrophils. By exposing the autoantigens targeted by ANCA, NETs increase the production of these pathogenic antibodies that, in turn, will target new neutrophils to induce NET release, leading thus to an amplification loop of the autoimmune response. Concomitantly, during SVV, NETs can be trapped in small-vessels inducing endothelial injury. Fluorescent microscopy analysis of kidney biopsies from SVV patients have provided evidence of NETs tightly associated to sites of glomeruli endothelial and interstitial lesions (Kessenbrock et al. 2009). Importantly, a link between NETs and the specific immune response in SVV has been identified (Sangaletti et al. 2012). Myeloid dendritic cells loaded with NETs become fully activated and able to induce, in mice, ANCA production and autoimmune vasculitis accompanied by parenchyma lesions in kidney and lungs. Immunogenicity of NETs in this

model is dependent on the DNA integrity (Sangaletti et al. 2012). NETs themselves have also been identified as able to directly prime T lymphocytes, lowering their activation threshold (Kaplan and Radic 2012).

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by the presence of circulating immune complexes. In SLE, autoantibodies are mainly directed against nuclear antigens, including double-stranded DNA and different nuclear proteins. Recently, antibodies directed against neutrophil proteins have also been identified; in particular against LL-37, an antimicrobial peptide of the cathelicidin family, abundantly associated to NETs formed by neutrophils from SLE patients (Dorner 2012). During the last three years, various mechanisms have been described demonstrating the prolonged exposition and modified immunogenicity of self antigens associated to NETs in SLE. The half life of NETs in SLE patients can be increased by multiple factors including both the protection of DNA against the action of nucleases by the different proteins and autoantibodies associated with NETs, and the direct inhibition of serum DNase-1 by the complement fragment C1q deposited on NETs. The immunogenicity of self-antigens associated with NETs is susceptible of being modified by the presence of several danger signals in the same structure. In SLE, the presence of LL-37 and HMGB-1 in NETs renders self-DNA immunogenic and is suspected of initiating an insidious pathogenic loop. These immunogenic NETs engage the TLR-9 receptors on plasmacytoid dendritic cells (pDC) and elicit the production of IFN $\alpha$ . In turn, IFN $\alpha$  primes neutrophils enhancing their efficacy to produce NETs upon activation by circulating immune complexes. Concomitantly, by exposing self-antigens such as self DNA and ribonucleoproteins, NETs might boost the production of auto-antibodies, increasing the rate of circulation immune complexes that activate neutrophils to produce NETs, thus closing this pathogenic loop (Brinkmann and Zychlinsky 2012; Dorner 2012; Saffarzadeh and Preissner 2012). This mechanism first described for human SLE, has been confirmed in mice. The complex DNA / Cramp (murin orthologue of LL37) activates the production of IFN $\alpha$  by pDC and leads to the production of antinuclear autoantibodies and to pathological manifestations of SLE (Kaplan and Radic 2012; Saffarzadeh and Preissner 2012).

The immunogenicity of the self-antigens associated to NETs can also be altered by the post-transcriptional modifications undergone during NET formation (e.g. oxidation, citrullination). This is the case of citrullinated histones that become the target of auto-antibodies during Felty's syndrome, a form of arthritis accompanied by neutropenia. Auto-antibodies present in

sera from patients with Felty's syndrome bind to NETs, in particular to citrullinated histones (Brinkmann and Zychlinsky 2012; Kaplan and Radic 2012).

### **3. Atherosclerosis**

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease affecting arterial endothelium. Atherosclerotic lesions start as lipid streaks in the intima, the innermost layer of endothelial walls. These streaks are characterized by the presence of macrophages with a lipoprotein-rich cytoplasm: the foam cells. The evolution of atherosclerotic lesions is progressive, forming prominent atheromatous plaques with a lipid rich core surrounded by a fibrous layer and the intima, infiltrated by various leukocyte types, mainly macrophages, lymphocytes and pDCs. (Drechsler et al. 2011). Neutrophils are not abundantly found in atherosclerosis lesions. However, recent studies demonstrate interesting correlations between atherosclerosis lesions and the presence of NETs (Doring et al. 2012; Drechsler et al. 2011; Megens et al. 2012).

NETs are present in atherosclerosis lesions in mice and human (Doring et al. 2012; Megens et al. 2012). On early atheromas in mice, extracellular structures with colocalized signals of DNA and Cramp (murin orthologue of LL37) are present in necrotic core areas (Doring et al. 2012). NETS are also detected in the luminal area of these lesions (Megens et al. 2012). This DNA / Cramp complex has a proven pathogenic role in SLE that has also been demonstrated in a murine model of atherosclerosis. By activating local pDC through TLR9, DNA / Cramp complex induce the production of IFN $\alpha$  (Doring et al. 2012). This cytokine primes neutrophils, enhancing their capacity to produce NETs (Dorner 2012). Moreover, human and mice suffering from atherosclerosis have circulating anti-DNA autoantibodies (Doring et al. 2012), possibly boosted by NETs themselves, as has been proposed in the case of SLE (Brinkmann and Zychlinsky 2012; Dorner 2012; Saffarzadeh and Preissner 2012). Immune complexes formed with these antibodies might activate NET formation (Dorner 2012). Hence, NETs contribute to atherosclerosis enhancing endothelial lesions by their cytotoxicity, providing immunogenic stimulus to innate immune cells and adding an autoimmune component to this disease.

## Interactions with other Processes and Drugs

The release of NETs conveys beneficial but also adverse consequences. NETs accomplish a non disputable role in controlling infections. However, their cytotoxic effects impact the integrity of host tissues and they are also implicated in the breaking of immune tolerance. Therapeutic strategies to control NET formation and / or their clearance can be oriented either to increase their production to better control infections, or to reduce their presence in order to avoid their adverse effects.

The antimicrobial function of neutrophils cannot be entirely and permanently substituted by pharmacologic antimicrobial treatments, as drug resistance hampers their use. Neutrophils and, in particular, NETs are necessary to control infections. This has been clearly demonstrated through the aforementioned case of a CGD patient in whom a gene therapy recovering NOX2 function allowed the recovery of neutrophils' capacity to perform oxidative burst and to produce NETs. Both features correlated to the capacity of patient to control a drug refractory pulmonary aspergillosis (Brinkmann and Zychlinsky 2012). Developing strategies to enhance NET formation could be inspired by the case with statins; therapeutic molecules used to reduce serum cholesterol levels. Patients following statins treatment show a reduced risk to bacterial infections, correlated with the capacity of these molecules to boost the production of NETs (Chow et al. 2010).

On the contrary, inhibiting NET production might be possible with various pharmacological approaches. In particular, ROS scavengers, PAD4 inhibitors and MEK-ERK kinase pathway inhibitors reduce NET production *in vitro* (Kaplan and Radic 2012). However, none of these inhibitors is specific for NET formation as they have a broad effect spectrum. Recently, IL-10 has been described as a physiological inhibitor of NET formation (Saitoh et al. 2012). Alternatively, dismantling NETs by DNases or neutralizing the action of some their components, mainly histones, decreases tissue injury in both *in vitro* and *in vivo* pathology models (Saffarzadeh and Preissner 2012). Neutralizing histones can be achieved by several mechanisms: the use of activated protein C or plasmin that degrade histones, the use of polysialic acids that outcompetes histone binding to DNA or to negative charged surface, or by using specific antibodies (Saffarzadeh and Preissner 2012).

In conclusion, a better knowledge of the mechanisms controlling the formation of NETs and their effects is required to develop therapeutic tools that could specifically enhance or inhibit the release of NETs or that allow blocking individual components of NETs involved in their adverse effects.

### **Cross-References**

Inflammation and autoimmunity  
Neutrophil oxidative burst  
Platelet, endothelium and inflammation  
Sepsis models in animals  
Regulatory T cells

Inflammatory Diseases  
Inflammatory Processes and Cells  
Inflammatory Processes and Cells  
Inflammatory Processes and Cells  
Inflammatory Processes and Cells

## References

- Azevedo, E.P., Guimaraes-Costa, A.B., Torezani, G.S., Braga, C.A., Palhano, F.L., Kelly, J.W., Saraiva, E.M., and Foguel, D. (2012). Amyloid Fibrils Trigger the Release of Neutrophil Extracellular Traps (NETs), Causing Fibril Fragmentation by NET-associated Elastase. *J. Biol. Chem.* 287, 37206-37218.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-1535.
- Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* 198, 773-783.
- Chen, K., Nishi, H., Travers, R., Tsuboi, N., Martinod, K., Wagner, D.D., Stan, R., Croce, K., and Mayadas, T.N. (2012). Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood* 120, 4421-31
- Chow, O.A., von Kockritz-Blickwede, M., Bright, A.T., Hensler, M.E., Zinkernagel, A.S., Cogen, A.L., Gallo, R.L., Monestier, M., Wang, Y., Glass, C.K., and Nizet, V. (2010). Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell Host Microbe* 8, 445-454.
- Doring, Y., Drechsler, M., Wantha, S., Kemmerich, K., Lievens, D., Vijayan, S., Gallo, R.L., Weber, C., and Soehnlein, O. (2012). Lack of neutrophil-derived CRAMP reduces atherosclerosis in mice. *Circ. Res.* 110, 1052-1056.
- Dorner, T. (2012). SLE in 2011: Deciphering the role of NETs and networks in SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 68-70.
- Drechsler, M., Doring, Y., Megens, R.T., and Soehnlein, O. (2011). Neutrophilic granulocytes - promiscuous accelerators of atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* 106, 839-848.
- Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176, 231-241.
- Garcia-Romo, G.S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R.L., *et al.* (2011). Netting neutrophils are major

- inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 3, 73ra20.
- Guimaraes-Costa, A.B., Nascimento, M.T., Wardini, A.B., Pinto-da-Silva, L.H., and Saraiva, E.M. (2012). ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J. Parasitol. Res.* 2012, 929743.
- Kaplan, M.J., and Radic, M. (2012). Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J. Immunol.* 189, 2689-2695.
- Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schonermarck, U., Back, W., Gross, W.L., Werb, Z., Grone, H.J., Brinkmann, V., and Jenne, D.E. (2009). Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* 15, 623-625.
- Marin-Esteban, V., Turbica, I., Dufour, G., Semiramoth, N., Gleizes, A., Gorges, R., Beau, I., Servin, A.L., Lievin-Le Moal, V., Sandre, C., and Chollet-Martin, S. (2012). Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain C1845 induces neutrophil extracellular traps that kill bacteria and damage human enterocyte-like cells. *Infect. Immun.* 80, 1891-1899.
- McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B.G., Jenne, C.N., and Kubes, P. (2012). Intravascular Neutrophil Extracellular Traps Capture Bacteria from the Bloodstream during Sepsis. *Cell Host Microbe* 12, 324-333.
- Megens, R.T., Vijayan, S., Lievens, D., Doring, Y., van Zandvoort, M.A., Grommes, J., Weber, C., and Soehnlein, O. (2012). Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* 107, 597-598.
- Meng, W., Paunel-Gorgulu, A., Flohe, S., Hoffmann, A., Witte, I., Mackenzie, C., Baldus, S.E., Windolf, J., and Logters, T.T. (2012). Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit. Care* 16, R137.
- Munafò, D.B., Johnson, J.L., Brzezinska, A.A., Ellis, B.A., Wood, M.R., and Catz, S.D. (2009). DNase I inhibits a late phase of reactive oxygen species production in neutrophils. *J. Innate Immun.* 1, 527-542.
- Papayannopoulos, V., and Zychlinsky, A. (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 30, 513-521.
- Patel, S., Kumar, S., Jyoti, A., Srinag, B.S., Keshari, R.S., Saluja, R., Verma, A., Mitra, K., Barthwal, M.K., Krishnamurthy, H., *et al.* (2010). Nitric oxide donors release extracellular

- traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide* 22, 226-234.
- Pilszczek, F.H., Salina, D., Poon, K.K., Fahey, C., Yipp, B.G., Sibley, C.D., Robbins, S.M., Green, F.H., Surette, M.G., Sugai, M., *et al.* (2010). A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 185, 7413-7425.
- Remijsen, Q., Vanden Berghe, T., Wirawan, E., Asselbergh, B., Parthoens, E., De Rycke, R., Noppen, S., Delforge, M., Willems, J., and Vandenabeele, P. (2011). Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 21, 290-304.
- Saffarzadeh, M., and Preissner, K.T. (2013). Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection. *Curr. Opin. Hematol.* 20, 3-9.
- Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T., Iwasaki, H., Omori, H., Yamaoka, S., *et al.* (2012). Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* 12, 109-116.
- Sangaletti, S., Tripodo, C., Chiodoni, C., Guarnotta, C., Cappetti, B., Casalini, P., Piconese, S., Parenza, M., Guiducci, C., Vitali, C., and Colombo, M.P. (2012). Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* 120, 3007-3018.
- Schorn, C., Janko, C., Latzko, M., Chaurio, R., Schett, G., and Herrmann, M. (2012). Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front. Immunol.* 3, 277.
- Tillack, K., Breiden, P., Martin, R., and Sospedra, M. (2012). T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.* 188, 3150-3159.
- Urban, C.F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P.R., and Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 5, e1000639.

Yipp, B.G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C.N., Scott, B.N., Zbytnuik, L.D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H.C., *et al.* (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* 18:1386-1393

## Figure legend

**Figure 1. Visualization of NETs after *in vitro* neutrophil stimulation.** Various stimuli activate neutrophils to release their chromatin decorated with proteins from the different cell compartments. Upon human neutrophil activation with PMA, NETs are released and are visualized by fluorescence microscopy after DNA staining with DAPI (upper panel) and lactoferrin staining with specific antibodies (middle panel). The merging of both images allows the identification of neutrophils which retain their membrane integrity, preventing intracellular lactoferrin staining. More interestingly, some nuclei have a more diffused staining and large extracellular structures are formed where DNA and lactoferrin colocalize. These structures correspond to NETs.

**Figure 2. Models of NET formation.** The formation of NETs seems to be related to different mechanisms according to the activation stimulus. **A)** *In vitro* activation of human neutrophils with PMA induces netosis, a cell death program that ends with the release of NETs. NETs correspond to the decondensed chromatin decorated with proteins from granular and cytoplasmic compartments. **B)** Priming with GM-CSF followed by activation with C5a or LPS leads to a rapid release (15 minutes) of mitochondrial DNA decorated with proteins from cytoplasmic granules. Neutrophils retain cell integrity and show increased survival due to activation. **C)** In some models of bacterial infection and sepsis, after 20 minutes of infection, neutrophils release their chromatin decorated with proteins from granular compartments. Neutrophils become enucleated but retain granules to accomplish pathogen phagocytosis and killing.



Figure 1

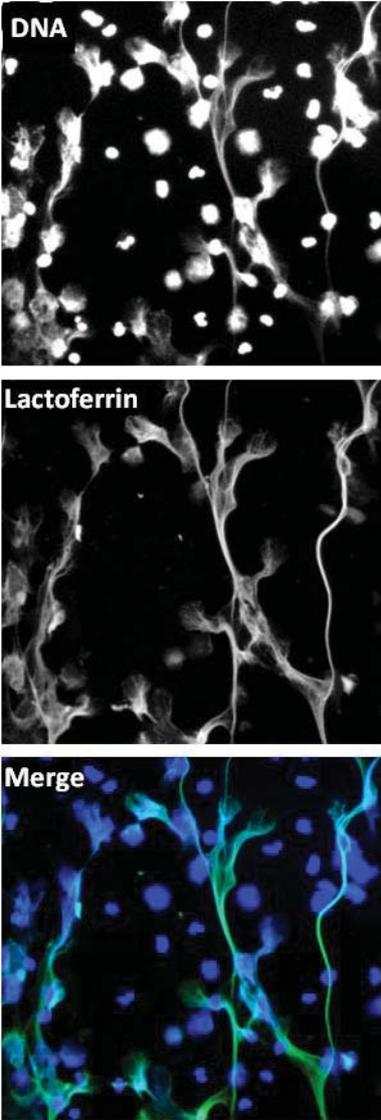
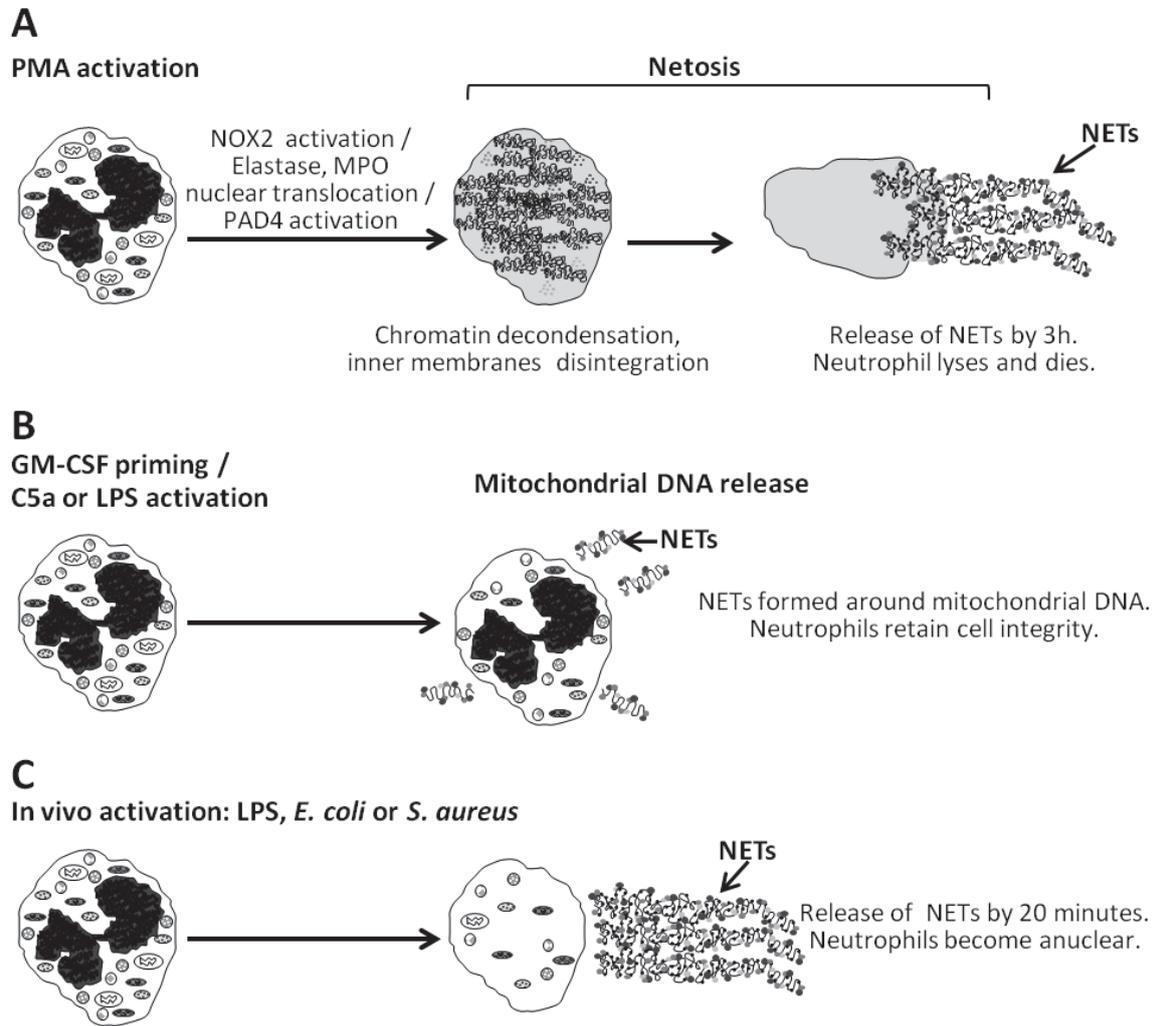




Figure 2





# Modulation fonctionnelle des cellules dendritiques par les « Neutrophil Extracellular Traps »

## Résumé:

Les polynucléaires neutrophiles (PN) sont des cellules essentielles au cours de la réponse immunitaire innée ; recrutés rapidement au site inflammatoire où ils participent à la phase aigüe, ils vont aussi contribuer à la résolution de l'inflammation. Ils peuvent en effet moduler la réponse adaptative par interaction avec les lymphocytes (Ly) ou les cellules dendritiques (DC) *via* des médiateurs solubles ou des interactions cellulaires directes. Les Neutrophil Extracellular Traps (NETs) libérés par les PN activés pourraient jouer un rôle important dans ce contexte. Les NETs sont des filaments de chromatine décondensée associés à des protéines issues principalement des granulations et du cytoplasme. Ils sont essentiels dans la réponse anti-infectieuse mais semblent également impliqués dans la physiopathologie de certaines maladies auto-immunes et inflammatoires. L'objectif de ce travail a été d'évaluer les effets des NETs sur la maturation des DC dans un contexte inflammatoire au cours duquel les PN et les DC peuvent co-exister, assurant ainsi un pont entre immunité innée et immunité adaptative. La première partie de ce travail a consisté à développer un modèle de production, isolement et caractérisation des NETs issus de PN sanguins humains. L'ionophore de calcium A23187 a été choisi pour induire les NETs et l'enzyme de restriction AluI a permis la récupération de fragments de NETs de taille hétérogène. Certains des composants de ces NETs sont quantifiables (ADN, élastase, histone 3 en particulier), et nous avons montré qu'ils conservaient leurs capacités bactéricides *in vitro*. Ces échantillons de NETs constituent donc un outil biologique standardisé, permettant d'évaluer leurs effets sur des cellules ou des tissus. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons mis en évidence que ces NETs purifiés régulaient négativement la maturation de moDC induites par le LPS (expression de HLA-DR, CD80, CD83, CD86 et production de TNF $\alpha$ , IL-12, IL-6, IL-23). De plus, les NETs diminuent la capacité de ces moDC à induire la prolifération des LyT, et leur polarisation est modulée en favorisant la production de cytokines de type Th2 (IL-5 et IL-13) aux dépens de cytokines de types Th1 (INF $\gamma$ ) et Th17 (IL-17). De manière intéressante, la capacité de migration des moDC activées par le LPS n'est pas modifiée en présence de NETs. En résumé, ces résultats suggèrent que les NETs pourraient jouer un rôle immunorégulateur sur la maturation des moDC dans des conditions inflammatoires. Les NETs produits par les PN activés pourraient ainsi participer à la régulation indispensable de la réponse inflammatoire.

## Mots clés :

Neutrophil Extracellular Traps, polynucléaire neutrophile, cellule dendritique, inflammation, lymphocyte T, réponse immune, interaction cellulaire.

## Laboratoire de rattachement :

INSERM UMR-S 996 - Équipe II « Mécanismes de la signalisation des cellules de l'immunité innée en immunopharmacologie et immunotoxicologie », Pr Marc Pallardy.

Faculté de Pharmacie, 5 rue JB Clément, 92290 CHATENAY-MALABRY- France

**Pôle : PHARMACOLOGIE – TOXICOLOGIE**

UNIVERSITÉ PARIS-SUD